

Diazeniumdiolate als direkte NO-Donoren

-

Synthese, Pharmakologie und Untersuchung der
NO-Freisetzungskinetik durch Laser Magnet Resonanz
Spektroskopie

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Axel Horstmann

geboren am 14.11.1972 in Grevenbroich

Diazeniumdiolate als direkte NO-Donoren

-

Synthese, Pharmakologie und Untersuchung der
NO-Freisetzungskinetik durch Laser Magnet Resonanz
Spektroskopie

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Axel Horstmann

geboren am 14.11.1972 in Grevenbroich

Gutachter

1. Prof. Dr. Jochen Lehmann
2. Prof. Dr. Gerhard Scriba
3. Prof. Dr. Hans-Jürgen Duchstein

Tag der Doktorprüfung:

24.11.2003

Tag der öffentlichen Verteidigung:

15.12.2003

Meinen Eltern.

Die vorliegende Arbeit entstand unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Jochen Lehmann am Institut der Pharmazeutischen Chemie, Endenich, der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Jochen Lehmann danke ich sehr herzlich für die Überlassung des Themas, seine wertvollen Anregungen, die stete Diskussionsbereitschaft und Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Hans-Jürgen Duchstein und Herrn Gerhard Scriba danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferats.

Herrn Ralph Gäbler von der Firma INVIVO® danke ich für die Bereitstellung der LMRS-Apparatur sowie für die freundschaftliche Zusammenarbeit bei der Erarbeitung neuer analytischer Methoden.

Mein Dank gilt auch den Mitarbeitern des Instituts für angewandte Physik in Bonn unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Wolfgang Urban, insbesondere Herrn Lars Menzel, Herrn Andreas Jentsch und Herrn Heiko Ganser für die fruchtbare Kooperation.

Bedanken möchte ich mich bei allen Kollegen und Freunden des Arbeitskreises für die stete Hilfsbereitschaft und gute Zusammenarbeit, insbesondere bei Herrn Christoph Wessler für die freundschaftliche Zusammenarbeit während der gemeinsamen Labortätigkeit.

Frau Christina Koch danke ich für die moralische Unterstützung und liebevolle Zuwendung bei der Fertigstellung dieser Arbeit.

Diese Arbeit widme ich meinen Eltern, Dagmar und Rolf-Dieter Horstmann, in Dankbarkeit für die vielfältige Unterstützung.

Inhaltsverzeichnis

A	Einleitung.....	1
1.	Molekulare Grundlagen und Funktion der endogenen NO-Produktion.....	1
1.1.	Der NO/cGMP-Signaltransduktionsweg.....	2
1.2.	NO induzierte Vasodilatation.....	2
1.3.	Thrombozytenaggregationshemmende Wirkung des NO.....	4
1.4.	Antiadhäsive Wirkung des NO.....	4
1.5.	Antiproliferative Wirkung des NO.....	4
1.6.	Antioxidative Wirkung des NO.....	6
2.	NO-Donoren.....	6
1.1.	Therapeutisch eingesetzte NO-Donoren.....	6
1.1.1.	Organische Nitrate.....	7
1.1.2.	Molsidomin und Nitroprussid-Natrium.....	8
1.2.	Neue NO-Donoren.....	8
1.2.1.	S-Nitrosothiole.....	9
1.2.2.	Diazeniumdiolate.....	10
3.	Themenstellung.....	12
B	Allgemeiner Teil.....	16
1.	Chemie der Diazeniumdiolate.....	16
1.1.	Bekanntes zur Chemie der Diazeniumdiolate.....	16
1.1.1.	Stabilität und Lagerung der Diazeniumdiolate.....	18
1.1.2.	Zerfallskinetik und NO-Freisetzung aus Diazeniumdiolaten.....	19
1.1.3.	Nitrosaminbildung bei der Dissoziation von Diazeniumdiolaten.....	19
1.1.4.	Synthese von Diazeniumdiolaten.....	19
1.1.5.	Nebenprodukte der Diazeniumdiolat-Synthese.....	21
1.2.	Darstellung 1-substituierter Diazeniumdiolate.....	22
1.2.1.	Aufbau der Syntheseapparatur.....	22
1.2.2.	Durchführung der Synthese.....	24
1.2.3.	Synthese der Zielverbindungen.....	26
1.2.4.	Anmerkungen zur Reinheit 1-substituierter Diazeniumdiolate.....	35
1.3.	Darstellung O ² -vinylierter Diazeniumdiolate.....	35
2.	Analytik der Diazeniumdiolate - Untersuchungen der Freisetzung von Stickstoffmonoxid aus Diazeniumdiolaten durch Laser Magnet Resonanz Spektroskopie.....	38
2.1.	Literaturbekannte Verfahren zum Nachweis von Stickstoffmonoxid.....	38
2.1.1.	Colorimetrische Methoden.....	38
2.1.2.	NO-Elektroden.....	40
2.1.3.	Chemilumineszenz Spektroskopie.....	41
2.1.4.	Elektronenspin Resonanz Spektroskopie.....	42
2.2.	Grundlagen der Laser Magnet Resonanz Spektroskopie.....	44
2.3.	Versuchsaufbau.....	46
2.3.1.	Liberationszellen.....	47
2.3.2.	LMR-Detektionseinheit.....	48
2.4.	Kalibrierung und Bestimmung der Nachweisempfindlichkeit.....	48
2.5.	Durchführung der Freisetzungsversuche.....	50
2.6.	Auswertung der Freisetzungsversuche.....	52
2.6.1.	Bestimmung der Freisetzungskinetik.....	52
2.6.2.	Grenzen der Methode.....	55

2.6.3.	Quantitative Auswertung.....	57
2.7.	Einflussfaktoren der NO-Freisetzung.....	58
2.7.1.	pH-abhängige NO-Freisetzung.....	58
2.7.2.	Temperaturabhängige NO-Freisetzung.....	61
2.7.3.	NO-Freisetzung in Abhängigkeit von Fließgeschwindigkeit und Puffervolumen.....	64
2.7.4.	NO-Freisetzung in Gegenwart von Thiolen.....	74
2.8.	Untersuchung der Struktur-Freisetzungsbeziehung von Diazeniumdiolaten....	75
2.8.1.	Versuchsdurchführung.....	76
2.8.2.	Ergebnisse der pH-abhängigen Untersuchungen.....	76
2.8.3.	Ergebnisse der temperaturabhängigen Untersuchungen.....	88
2.8.4.	Diskussion.....	90
C	Pharmakologischer Teil.....	95
1.	Freisetzung von NO aus Diazeniumdiolaten in Tierblut.....	95
1.1.	Vorbereitung der Versuche.....	95
1.2.	NO-Freisetzung in stabilisiertem Tierblut.....	96
1.3.	NO-Freisetzung in wässrigen Pufferlösungen.....	96
1.4.	Ergebnisse.....	97
2.	Bestimmung der Stoffwechselprodukte des NO in Tierblut.....	98
2.1.	Der NO-Stoffwechsel.....	98
2.1.1.	Bildung des Nitrosylkations.....	99
2.1.2.	Bildung des Nitroxylanions.....	99
2.1.3.	Reaktionen von NO mit Hämoglobin.....	101
2.2.	Durchführung und Ergebnis der Metabolitenbestimmung.....	102
2.2.1.	Bestimmung des NO-Hämoglobin-Komplexes.....	103
2.2.2.	Bestimmung des Nitrits.....	104
2.2.3.	Bestimmung der S-Nitrosothiole.....	106
2.2.4.	Bestimmung des Nitrats.....	107
2.3.	Zusammenfassung.....	108
3.	Untersuchungen zur Vasorelaxation an Koronararterien.....	110
3.1.	Methoden.....	110
3.2.	Vasorelaxation an intakten Koronararterien des Hausschweins.....	111
3.3.	Vasodilatation an mit L-NNA präinkubierten Koronararterien.....	111
3.4.	Vasodilatation an toleranten Koronararterien.....	112
3.5.	Relaxationsgeschwindigkeit und Reversibilität.....	112
3.6.	Diskussion und Zusammenfassung.....	113
D	Zusammenfassung.....	116
E	Experimenteller Teil.....	118
1.	Abkürzungsverzeichnis.....	118
2.	Verzeichnis der benutzten Geräte und Analysenmethoden.....	119
3.	Allgemeine Arbeitsvorschriften (AAV).....	120
4.	Monographien.....	121
F	Literaturverzeichnis.....	142

A Einleitung

Seit der Entdeckung des EDRF (*endothelium derived relaxing factor*) durch *Furchgott* und *Zawadzki* (Furchgott and Zawadzki, 1980) und seiner Identifizierung als Stickstoffmonoxid durch *Palmer* und *Moncada* (Palmer et al., 1987) sowie *Ignarro* (Ignarro et al., 1987) hat die NO Forschung eine atemberaubende Entwicklung erlebt, die durch die Verleihung des Nobelpreises für Medizin an *Furchgott*, *Ignarro* und *Murrad* im Jahre 1998 ihren vorläufigen Höhepunkt fand. Diesen Pionierarbeiten ist die Aufklärung der bioregulativen Rolle von NO in Gefäß-, Immun- und Nervensystem zu verdanken, die mittlerweile auf eine Vielzahl physiologischer und pathophysiologischer Prozesse ausgeweitet wurde. So ist Stickstoffmonoxid neben der Regulation des Vasotonus beispielsweise an der Steuerung der Atemfunktion, der Nierenfunktion, des Gastrointestinaltraktes, der Immunantwort oder der neuronalen Erregungsübertragung maßgeblich beteiligt.

Die Funktion des NO im kardiovaskulären System steht bis heute im Mittelpunkt des wissenschaftlichen Interesses und ist am weitesten aufgeklärt. Auch die Wirkstoffgruppe der NO-Donoren, mit der sich diese Arbeit befasst, wird klinisch bisher ausschließlich zur Behandlung kardiovaskulärer Erkrankungen eingesetzt.

Dieses Kapitel fasst daher zunächst die Grundlagen der endogenen NO-Produktion und der vaskulären Wirkung des gebildeten Stickstoffmonoxids zusammen. Anschließend werden literaturbekannte NO-Donoren und deren Anwendung dargestellt. Zuletzt wird die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit beschrieben.

1. Molekulare Grundlagen und Funktion der endogenen NO-Produktion

In elastischen Arterien ist die Intima der vollen Kraft des hohen systolischen Drucks ausgesetzt und wird im Laufe der Zeit geschädigt. Mit zunehmendem Alter kommt es daher zu atherosklerotischen Veränderungen und endothelialer Dysfunktion der Gefäße, die zu vaskulären Erkrankungen wie koronarer Herzkrankheit, Nierenarterienstenosen, cerebralen Durchblutungsstörungen oder erektiler Dysfunktion führen können (Busse and Fleming, 1996), (Schachinger et al., 2000).

Große Fortschritte wurden in der Aufklärung physiologischer Prozesse gemacht, die den vaskulären Erkrankungen zu Grunde liegen. Neben der steigenden Unempfindlichkeit auf vasodilatatorische Reize spielen Thrombozytenaggregation, Leukozytenadhäsion und Intimahyperplasie wichtige Rollen bei der Entstehung atherosklerotischer Plaques (Napoli and Ignarro, 2001).

Die endotheliale NO-Produktion ist ein wichtiges, körpereigenes antiatherosklerotisches Wirkprinzip. Sowohl endogen produziertes als auch exogen zugeführtes NO wirken

vasodilatatorisch, antiaggregatorisch, antiadhäsiv sowie antiproliferativ und antioxidativ (Müller and Kojda, 2002). Die durch NO induzierte Stimulation der löslichen Guanylatcyclase (sGC) und die nachfolgende cGMP-Produktion sind der erste und wichtigste Schritt der NO/cGMP-Signalkaskade (Lucas et al., 2000).

1.1. Der NO/cGMP-Signaltransduktionsweg

Die endogene NO-Produktion der Körperzellen wird von drei Isoformen der NO-Synthase (NOS) gesteuert. Neuronale, induzierbare und endotheliale NOS katalysieren die Umsetzung von L-Arginin (**1**) zu L-Citrullin (**2**) und NO unter Verbrauch von NADPH und molekularem Sauerstoff (*Abb. 1*) (Nathan and Xie, 1994). Die bedeutendste Isoform zur Steuerung von Gefäßtonus und Organdurchblutung ist die membrangebundene endotheliale NO-Synthase (eNOS) (Garcia-Cardena et al., 1996).

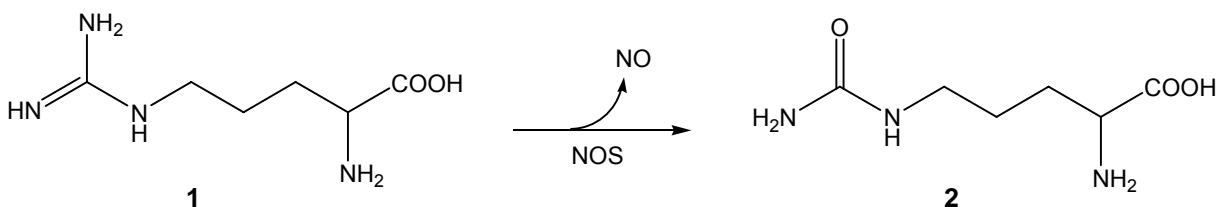


Abb. 1: Umsetzung von L-Arginin (1) zu L-Citrullin (2) und NO.

Der wichtigste physiologische Reiz für die eNOS-induzierte NO-Synthese sind Scherkräfte (*shear stress*), die das vorbeiströmende Blut auf die Endothelzellen ausübt (Pohl et al., 1986). Das gebildete NO aktiviert die sGC der angrenzenden Gefäßmuskelzellen. Dies geschieht durch Nitrosylierung der prosthetischen Häm-Gruppe, wobei das Eisen aus der Ebene des Porphyrinrings herausgehoben wird. Dadurch wird die Bindung von GTP und dessen Umwandlung zu cGMP als *second messenger* ermöglicht (Ignarro et al., 1999). cGMP wird durch verschiedene Phosphodiesterasen (PDE) deaktiviert. Dabei weist die PDE 5 die höchste Affinität zu cGMP auf (Soderling and Beavo, 2000).

Seinerseits kann cGMP die Aktivität einiger Phosphodiesterasen regulieren. So inhibiert cGMP die für die cAMP Deaktivierung zuständige PDE 3 und trägt damit zur Erhöhung der intrazellulären cAMP Konzentration bei (siehe auch *Abb. 3*).

1.2. NO induzierte Vasodilatation

cGMP steht am Anfang einer Reihe verschiedener Effektoren, die alle zu einer Senkung der freien intrazellulären Calciumkonzentration und damit zu einer Relaxation der glatten Muskelzellen führen (*Abb. 2*).

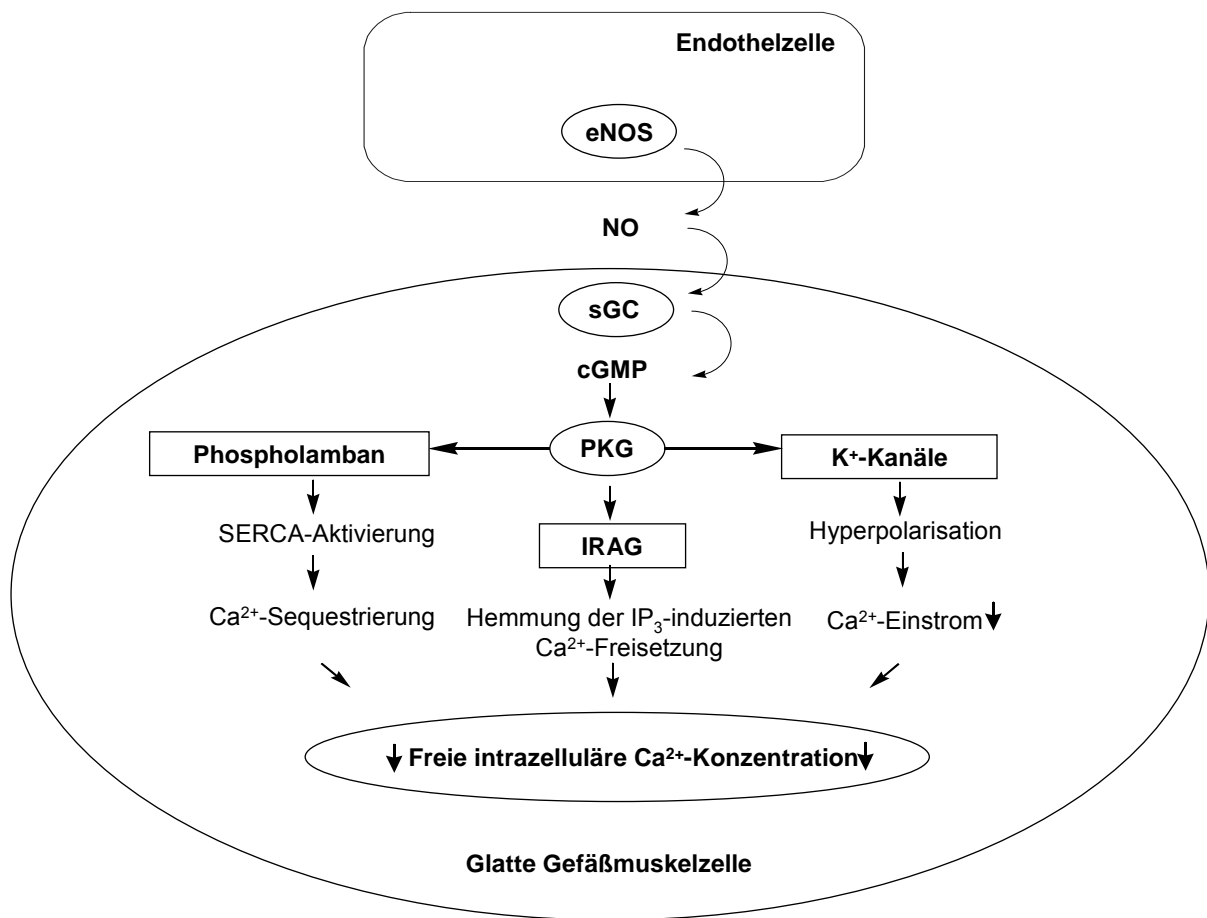


Abb. 2: Schematische Darstellung der NO induzierten Vasodilatation. Die Aktivierung der cGMP-abhängigen Proteinkinase führt zur Phosphorylierung wichtiger Proteine, die eine Senkung der freien intrazellulären Calciumkonzentration zur Folge haben und zur Relaxation der glatten Muskelzelle führt [nach (Müller and Kojda, 2002)].

Voraussetzung dafür ist eine der cGMP-Bildung nachgeschaltete Aktivierung der PKG II, einer cGMP abhängigen Proteinkinase, die durch Phosphorylierung verschiedener Membranproteine des sarkoplasmatischen Retikulums (sR) folgende Mechanismen anstößt:

- Über die Phosphorylierung von Phospholamban (Membranprotein des sR) erfolgt die Aktivierung von Ca^{2+} -ATPasen (*sarcoendoplasmatic reticulum ATPasen*, SERCA), die die Rückaufnahme von Ca^{2+} in das sarkoplasmatische Retikulum kontrollieren (Ca^{2+} -Sequestrierung) (Cornwell et al., 1991).
- Die Induktion des IRAG (*IP₃ receptor associated cGMP kinase substrate*) hat eine Hemmung der IP_3 -induzierten Ca^{2+} -Freisetzung zur Folge (Schlossmann et al., 2000).
- Die durch PKG II vermittelte Öffnung Ca^{2+} -abhängiger K^+ -Kanäle führt zu einer Stabilisierung des Membranpotentials (Hyperpolarisation) und damit zu einer Erhöhung der Reizschwelle für die Ca^{2+} Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (Bolotina et al., 1994).

Der Abfall des Calcium-Spiegels in den glatten Muskelzellen führt zu einer Relaxation der Gefäßmuskulatur und damit zu einer Vasodilatation der Gefäße.

1.3. *Thrombozytenaggregationshemmende Wirkung des NO*

Thrombozyten spielen eine wichtige Rolle in der vaskulären Hämostase des Säugetierorganismus. Geht die Endothelauskleidung der Gefäße in Folge mechanischer Belastung verloren, kommt es zur Anlagerung und Vernetzung von Blutplättchen an den verletzten Bereichen der Gefäßwand. Die Freisetzung von Thromboxan, ADP und Ca^{2+} vermittelt die Anheftung weiterer Blutplättchen, Phospholipide und Ca^{2+} aktivieren die Kaskade der Blutgerinnung.

Der NO induzierten Vasodilatation in *Abb. 2* ähnlich wird über die NO vermittelte cGMP Produktion und Absenkung der freien intrazellulären Calciumkonzentration in den Thrombozyten die Anlagerung und Vernetzung der Blutplättchen gehemmt (Rao et al., 1990).

1.4. *Antiadhäsive Wirkung des NO*

Die Adhäsion und Einwanderung von Leukozyten in die Gefäßwand fördern die Genese atherosklerotischer Plaques (Ross, 1999). Die in Folge von Läsionen und Entzündungen des Endothels entstandenen reaktiven Sauerstoffspezies induzieren die intrazelluläre Synthese redoxsensibler Transkriptionsfaktoren (Chen et al., 1999). Die nachgeschaltete Proteinbiosynthese führt zur Expression endothelmembranständiger Adhäsionsmoleküle. Monozyten, die an die Endothelzellen gebunden haben, wandern in die Gefäßwand ein und steigern wiederum den oxidativen Stress durch Freisetzung reaktiver Sauerstoffverbindungen (Ross and Fuster, 1996).

NO inhibiert die Bildung redoxsensibler Transkriptionsfaktoren und damit die Expression von Adhäsionsmolekülen. Der genaue Mechanismus konnte bisher nicht aufgeklärt werden. Eine wichtige Rolle spielt hierbei auch die antioxidative Wirkung von NO.

1.5. *Antiproliferative Wirkung des NO*

Atherosklerotische Veränderungen gehen einher mit der Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen (Schwartz, 1997). Dadurch verändern sich Morphologie und Funktion der Gefäße grundlegend: Myofibrillen werden reduziert, an ihre Stelle treten Matrixproteine. Im Laufe dieser Intimahyperplasie nehmen die Kontraktilität der Gefäße ab und ihre sekretorische Aktivität zu. Zentraler Schritt ist die Aktivierung der Proteinkinase Raf-1 (siehe *Abb.3*). Die Induktion der Raf-1 erfolgt durch extrazelluläre Wachstumsfaktoren, wie den PDGF (*platelet derived growth*

factor), und durch Angiotensin II (AT II), welches über die Aktivierung einer Proteinkinase (PKC) die mitogene Signaltransduktion stimuliert. Raf-1 phosphoryliert nachgeschaltete MAP-Kinasen (*mitogen activated protein*), durch deren Aktivität der Zellzyklus und die DNS-Synthese angestoßen wird (Davis, 1993).

Stickstoffmonoxid ist ein funktioneller Antagonist der Proliferation. Die Aktivierung der sGC und die nachfolgende cGMP Produktion hat eine Hemmung der Phosphodiesterase 3 zur Folge. PDE 3 steuert den Abbau von cAMP. Dadurch wird die intrazelluläre Konzentration des *second messengers* und die Aktivität der nachgeschalteten cAMP abhängigen Proteinkinasen (PKA) erhöht (Osinski and Schrör, 1999). PKA hemmen die mitogene Signaltransduktion, indem sie Raf-1 inhibieren (Cook and McCormick, 1993).

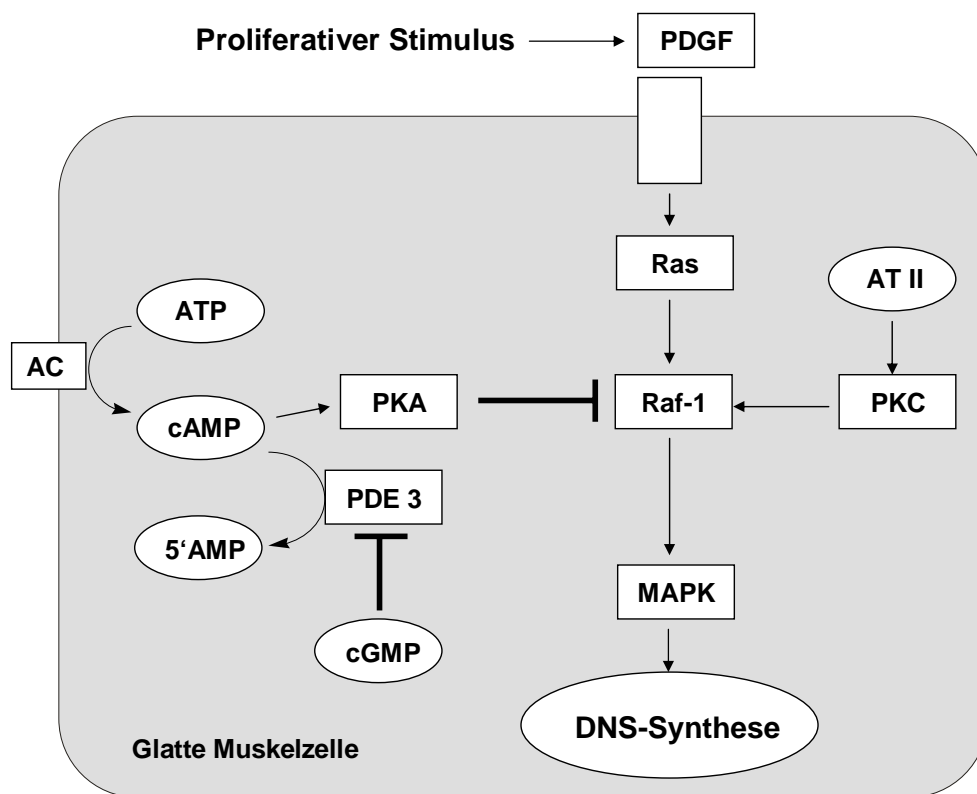


Abb. 3: Hemmung der Mitogenese durch cAMP/PKA. Durch die cGMP-induzierte Hemmung der Phosphodiesterase 3 (PDE) wird über cAMP eine für die Zellproliferation zentrale Proteinkinase (Raf-1) deaktiviert. (AC=Adenylatcyclase; AT II = Angiotensin II; PKC = Proteinkinase C; MAPK = mitogen activated protein kinase) [nach (Müller and Kojda, 2002).

1.6. *Antioxidative Wirkung des NO*

Oxidativer Stress fördert die Pathophysiologie kardiovaskulärer Erkrankungen (Kojda and Harrison, 1999). Schäden und Entzündungen der Gefäßendothelzellen sind die Ursachen für die Entstehung reaktiver Sauerstoffverbindungen, die durch die Phagozytoseaktivität vermehrt einwandernder Leukozyten zusätzlich verstärkt wird. Dabei spielt die Bildung des Superoxidanions eine wichtige Rolle. O_2^- reagiert beispielsweise schnell mit NO zu Peroxynitrit, welches durch Nitrierung von Tyrosin und durch Oxidation von Lipiden und SH-Gruppen Zellschäden verursacht (Koppenol, 1998).

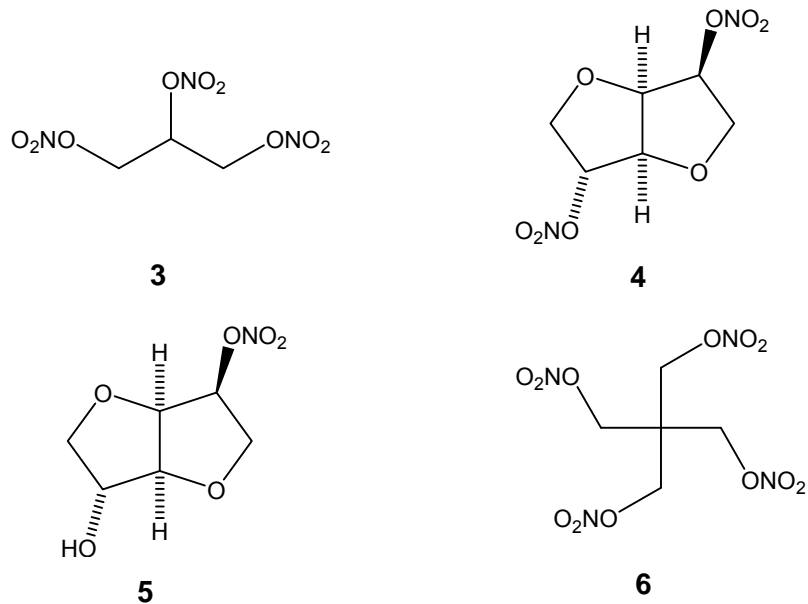
Durch die Induktion einer Superoxiddismutase (ecSOD) begünstigt NO allerdings gleichzeitig die H_2O_2 -Produktion und senkt damit die Peroxidkonzentration. Wasserstoffperoxid hingegen fördert die eNOS-Expression und steigert die eNOS-Aktivität. Für die eigentliche antioxidative Wirkung wird eine NO-induzierte Steigerung der Ferritinbildung diskutiert. Ferritin bindet freie Eisenionen und verringert Zellschäden durch Unterdrückung der Peroxidproduktion (Oberle et al., 1999).

2. **NO-Donoren**

NO-Donoren werden schon seit über 100 Jahren zur Therapie der koronaren Herzkrankheit eingesetzt. Amylnitrit und Glyceroltrinitrat (**3**) waren die ersten Vertreter der Gruppe der organischen Nitrit- bzw. Nitratester. Das von *Sobrero* (Sobrero, 1846) Mitte des 19. Jahrhunderts zunächst als Sprengstoff synthetisierte und von *Hering* in die Therapie eingeführte GTN (**3**) ist bis heute Mittel der ersten Wahl zur Anfallskupierung bei Angina Pectoris. Seit der Erkenntnis über die pharmakologische Vielseitigkeit des NO im menschlichen Organismus wurden neuartige NO-Donoren für neue therapeutische Applikationen entwickelt (Lehmann, 2000a). Die hohe Wirksamkeit der NO-Donoren ist mit der Nutzung des natürlichen, angelegten Weges der NO/cGMP-Signaltransduktion zu erklären.

2.1. *Therapeutisch eingesetzte NO-Donoren*

Zu den therapeutisch relevanten NO-Donoren zählen die organischen Salpetersäureester GTN (**3**), Isosorbiddinitrat (ISDN) (**4**), 5'-Isosorbidmononitrat (ISMN) (**5**) und Pentaerithryltetranitrat (PETN) (**6**), aus denen enzymatisch NO freigesetzt wird, sowie Molsidomin (**7**) und Nitroprussid-Natrium ($Na_2[Fe(CN)_5NO]$) (**8**), die nicht enzymatisch NO liberieren.



2.1.1. Organische Nitrate

Die NO-Freisetzung aus organischen Nitraten erfolgt enzymatisch in glatten Gefäßmuskelzellen. Die mitochondriale Aldehyd-Dehydrogenase (ALDH), die unter anderem an der Metabolisierung von Alkohol beteiligt ist, katalysiert die Reduktion der organischen Nitrats (Chen et al., 2002), in deren Folge Stickstoffmonoxid entsteht. Dadurch kommt es zur Aktivierung der sGC mit Bildung von cGMP und einer nachfolgenden Gefäßdilatation. Von der Dilatation sind im therapeutischen Dosisbereich hauptsächlich die venösen Kapazitäts- und größeren Koronargefäße, nicht aber die arteriellen Widerstandsgefäße betroffen (Bassenge and Strein, 1986). Diese Eigenschaft macht organische Nitrate zu idealen Koronardilatoren:

- Sie verbessern die koronare Durchblutung durch Vasodilatation des von der Stenose betroffenen Gefäßes.
- Die Relaxation im venösen Strombett führt zur Senkung der diastolischen Wandspannung (Vorlast) und zur Erhöhung des Sauerstoffangebots.
- Der Tonus der Widerstandsgefäße und der koronare Perfusionsdruck bleiben erhalten.

Organische Nitrate werden bei Angina pectoris Erkrankungen zur Anfallskupierung und Anfallsprophylaxe eingesetzt.

An isolierten Gefäßen konnte gezeigt werden, dass bei Dauerapplikation die vasodilatatorische Wirkung der Nitrate im Laufe der Zeit deutlich abgeschwächt wird. Für diese auch in der Therapie beobachtete Nitrattoleranz, die nach Absetzen des Präparates rasch reversibel ist, wird in erster Linie eine Gegenregulation oder eine Erschöpfung körpereigener Reduktionssysteme diskutiert. *Stamler* konnte zeigen, dass die Nitrattoleranz mit einem Verlust

2.2.1. S-Nitrosothiole

Neueren Studien zufolge sind S-Nitrosothiole (=Thionitrite) keine klassischen NO-Donoren (Foster and Stamler, 2003). Die bisher für diese Substanzgruppe angenommene NO-Freisetzung gemäß Gleichung Abb. 5 (a) konnte nur in vitro und in Gegenwart von Kupfer- oder Eisenionen (die in Spuren die meisten Pufferlösungen kontaminieren) beobachtet werden. In physiologischen Medien kommt es in Reaktionen mit weiteren Thiolen zur Übertragung des kurzlebigen NO^+ (Transnitrosierung) (b) oder unter Disulfidbildung zur Liberation von NO^- (c) (Hogg, 2002).

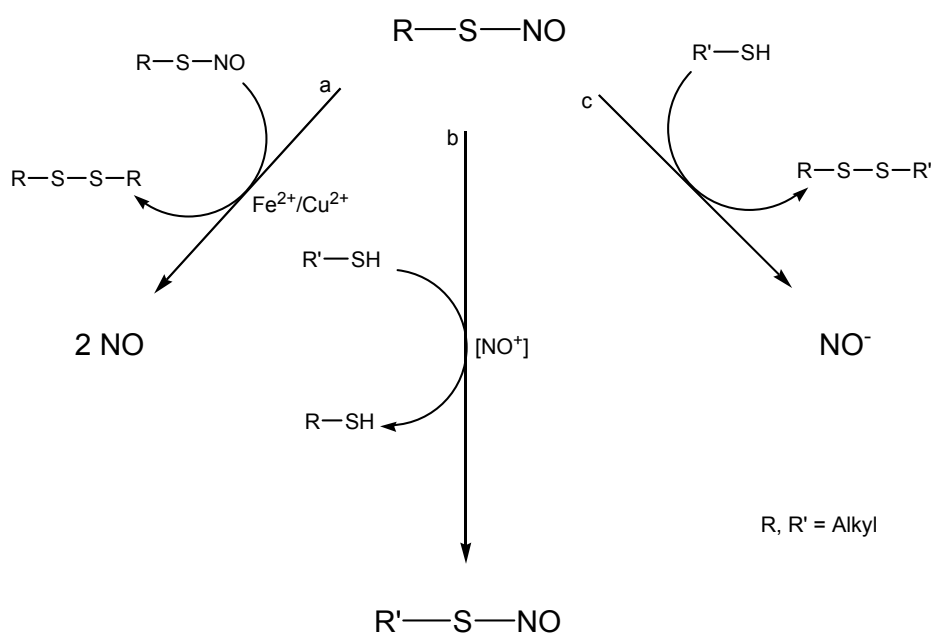
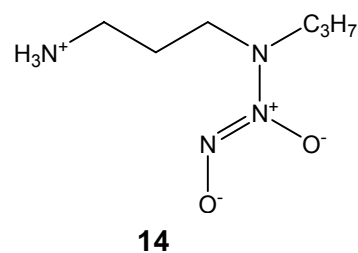
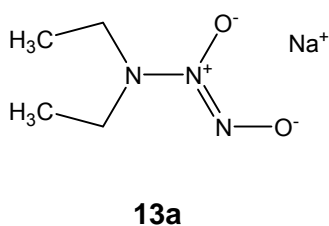
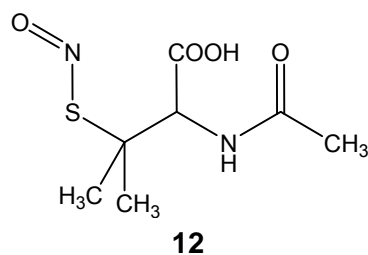


Abb. 5: Mögliche Reaktionen von S-Nitrosothiolen.

Mit S-Nitroso-N-acetyl-penicillamin (SNAP) (**12**) hat sich ein S-Nitrosothiol als „tool“ in pharmakologischen Experimenten durchgesetzt. Durch die sterische Abschirmung der Thionitrit-Gruppe zeichnet sich SNAP im Vergleich zu anderen Nitrosothiolen durch eine hohe Stabilität aus (Lehmann, 2000b).



2.2.2. Diazeniumdiolate

1-substituierte Diazen-1-ium-1,2-diolate - auch NONOate genannt - sind Salze, die die anionische $[N(O)NO]^-$ -Gruppe tragen. Liegt die funktionelle Gruppe an Stickstoff gebunden vor, spricht man von N-Diazeniumdiolaten. N-Diazeniumdiolate, die mit DEA/NO (**13a**) 1960 erstmals von *Drago* beschrieben wurden (Drago and Paulik, 1960), setzen gemäß Abb. 6 in wässrigen, nicht basischen Medien spontan zwei Moleküle NO frei und stellen als direkte NO-Donoren eine wichtige Alternative der heute experimentell eingesetzten NO-Donoren dar.

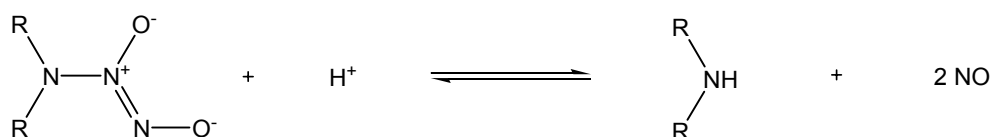


Abb. 6: Dissoziation von N-Diazeniumdiolaten.

Die Freisetzungsgeschwindigkeit der Diazeniumdiolate wird sowohl von der molekularen Struktur des Donors als auch von pH-Wert, Temperatur und Zusammensetzung des Mediums bestimmt. Die Wahl des Donors und der Versuchsparameter ermöglichen damit eine versuchsgerechte Steuerung der NO-Freisetzung (z.B. DEA/NO (**13a**): $t_{1/2}(22^\circ\text{C})$: 16 min, $t_{1/2}(37^\circ\text{C})$: 2-4 min; PAPA/NO (**14**): $t_{1/2}(22^\circ\text{C})$: 77 min, $t_{1/2}(37^\circ\text{C})$: 15 min (Keefer et al., 1996)). Eine Veresterung des endständigen Sauerstoffs (O^2) schützt die $[N(O)NO]^-$ -Gruppe vor Protonierung und verhindert damit die spontane Dissoziation in wässriger Lösung. Nach parenteraler Applikation können beispielsweise vinylierte NONOate frei in der Blutbahn zirkulieren, bis nach enzymatischer Abspaltung der Schutzgruppe die NO-Liberation am Zielorgan erfolgt (*targeted drug delivery*) (Hrabie and Keefer, 2002). Das von *Saavedra* synthetisierte V-PYRRO (**15**) ist ein vinyliertes *prodrug*, das aufgrund der leberprotektiven Wirkung des Stickstoffmonoxids im Tierversuch bei akutem Leberversagen eingesetzt wurde (Saavedra and Keefer, 1992).

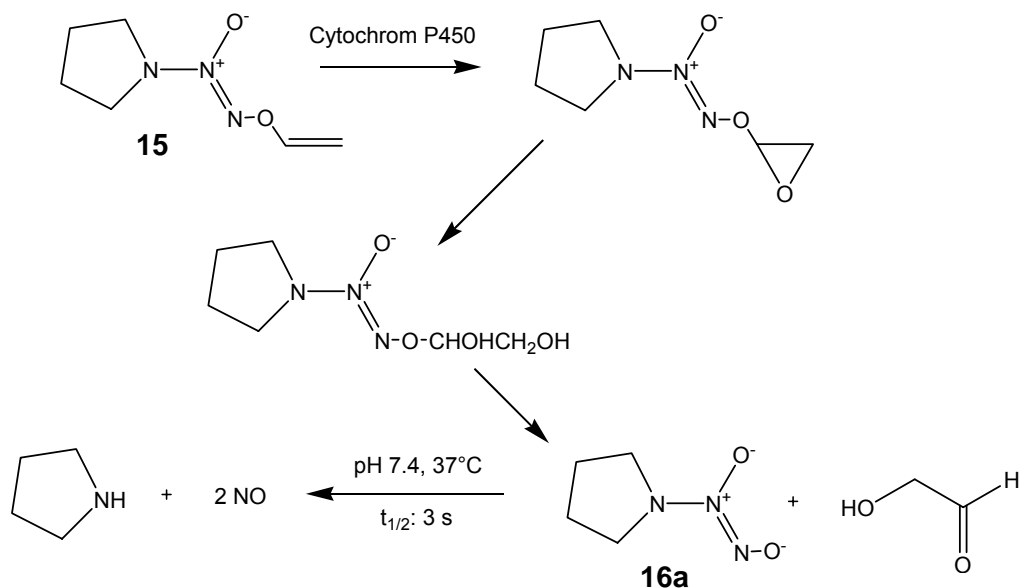


Abb. 7: Metabolismus von V-PYRRO (15). In der Leber wird die Schutzgruppe oxidiert und unter Bildung von PYRRO/NO (16a) abgespalten, welches sofort zu NO und Pyrrolidin dissoziiert.

Stickstoffhaltige Polymere können ebenfalls zu Trägern der Diazeniumdiolat-Gruppe umgesetzt werden (Abb. 8). Im Tierversuch finden „*diazeniumdiolated polymers*“ bei der Implantation von Gefäßprothesen (*stents*) oder bei der Ballondilatation Anwendung, um Thrombus-Bildung und Restenosen zu verhindern (Smith et al., 1996). Ausgenutzt wird hier die antiadhäsive und antiaggregatorische Wirkung des freigesetzten NO.

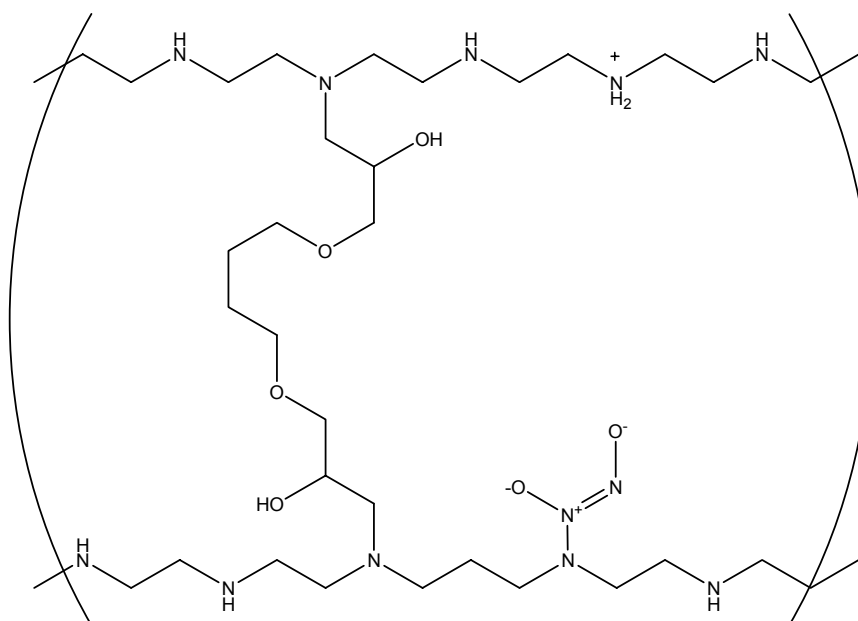


Abb. 8: Stickstoffhaltige Polymere als Träger der funktionellen [N(O)NO]-Gruppe.

Nachfolgend eine Auswahl von Literaturstellen, in denen NONOate als Tools für biochemische und medizinische Untersuchungen verwendet wurden (aus (Keefer, 1998) und (Hrabie and Keefer, 2002)).

- Diazeniumdiolate mit unterschiedlichen Zerfallshalbwertszeiten werden zur Aufklärung der vasodilatorischen Aktivität von NO herangezogen (Maragos et al., 1991).
- Die antikoagulierende Wirkung von Stickstoffmonoxid korreliert mit der NO-Freisetzungsrates von NONOaten (Diodati et al., 1993).
- Diazeniumdiolate hemmen die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen (Mooradian et al., 1995).
- Mit Hilfe von Diazeniumdiolaten kann das Wachstum kultivierter Tumorzellen gebremst werden (Maragos et al., 1993).
- Cytochrom P-450 wird durch den Einsatz von Diazeniumdiolaten inhibiert (Wink et al., 1993).
- NONOate dienen zur Bekämpfung von Parasiten (Rajan et al., 1996).
- Diazeniumdiolat-Polymere werden im Tierversuch erfolgreich zur Thrombozytenaggregationshemmung eingesetzt (Chen et al., 1997) und (Annich et al., 2000).
- NONOate werden im Tierversuch zur Behandlung der pulmonalen Hypertonie verwendet (Hampl et al., 1996).
- Lam et al. berichten über den Einsatz von Diazeniumdiolat-Aerosolen bei der Behandlung von ARDS-Patienten (*acute respiratory distress syndrom*) und streben eine Klinische Studie (Phase II) an (Lam et al., 2002).

3. Themenstellung

Aus dem Vorangegangenen wird deutlich, dass es sich bei den NONOaten um viel versprechende, in ihrem NO-Freisetzungsprofil sehr variable NO-Donoren handelt. Auf der anderen Seite gibt es weltweit, abgesehen von der hier führenden Gruppe um *Larry Keefer*, kaum Arbeitskreise, die sich mit der Synthese von NONOaten systematisch beschäftigen (Hrabie and Keefer, 2002). Durch die vorliegende Arbeit soll erstmals in unserem Arbeitskreis das Know-how der NONOat-Synthese etabliert, neue NONOate synthetisiert und die erhaltenen Substanzen bezüglich ihres NO-Freisetzungsprofils mit Hilfe einer neuen Analysentechnik (Laser Magnet Resonanz Spektroskopie) untersucht werden. Abschließend wird eine pharmakologische Evaluierung angestrebt.

Die wesentlichen Ziele dieser Arbeit lassen sich also wie folgt charakterisieren:

Synthese

Für die Synthese von Diazeniumdiolaten sollte eine geeignete Apparatur und ein Herstellungsverfahren entwickelt werden.

Um den elektronischen und sterischen Einfluss von Substituenten im Diazeniumdiolat-Molekül zu erkennen, sollte dann das schon von *Drago* hergestellte Piperidinderivat (I) als Basis dienen und in verschiedenen Positionen carboxylierte, alkylierte und kondensierte Analoga synthetisiert werden (Abb. 9) (Drago and Karstetter, 1961).

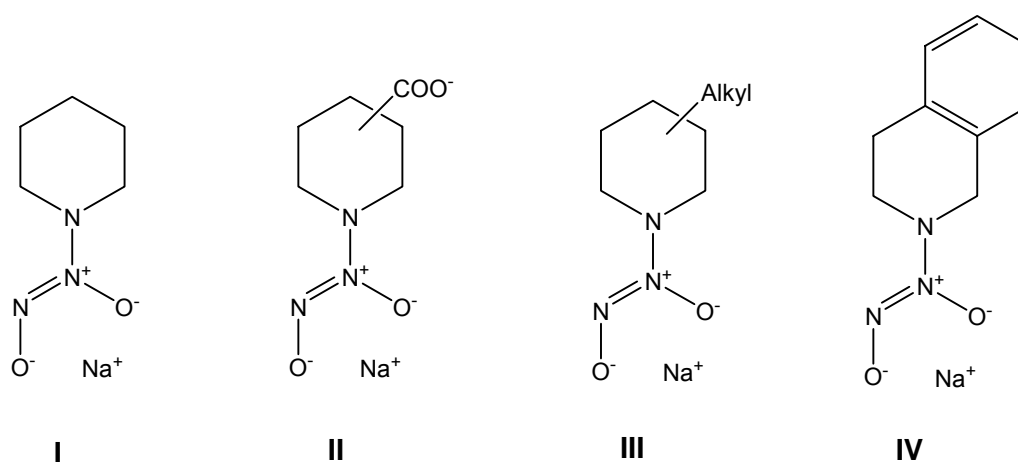


Abb. 9: Angestrebte Derivate des Natrium 1-(Piperidin-1-yl)diazen-1-ium-1,2-diolat. I: unsubstituiertes Piperidin. II: 2-, 3- und 4-carboxylierte Piperidinderivate. III: Alkylreste in verschiedenen Positionen des Piperidin. IV: Ankondensierter Benzolring am Piperidin.

Die Synthese weiterer, zum Teil literaturbekannter Diazeniumdiolate sollte mit den in Abb. 10 dargestellten Grundgerüsten durchgeführt werden.

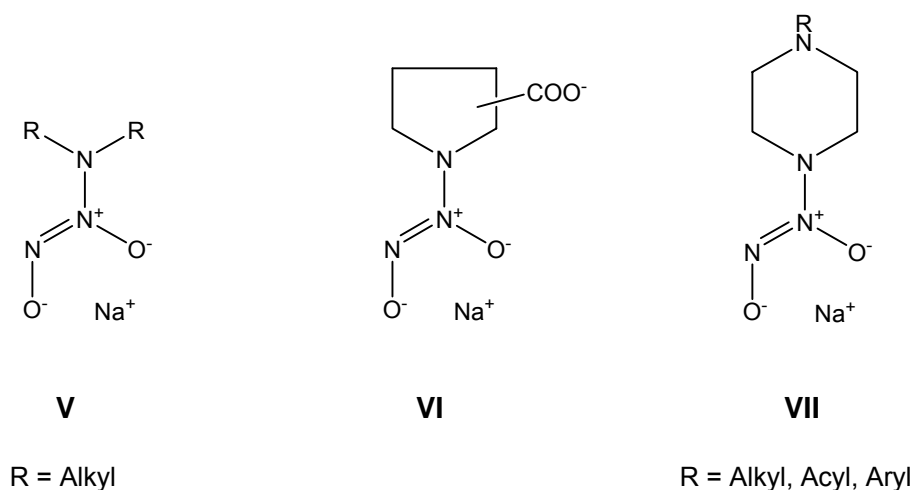
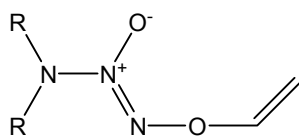


Abb. 10: Angestrebte Diazeniumdiolate.

Im Hinblick auf pharmakologische Untersuchungen sollten zudem O²-vinylierte Diazeniumdiolat-Prodrugs der allgemeinen Struktur **VIII** synthetisiert werden.

**VIII**

R = Alkyl

Abb. 11: Angestrebte O²-substituierte Diazeniumdiolate.

Analytik

Laser Magnet Resonanz Spektroskopie ist ein infrarotspektroskopisches Nachweisverfahren für Stickstoffmonoxid in der Gasphase. Bisher wurde es in Untersuchungen der menschlichen Atemluft und zur Umweltanalytik angewandt.

Analytisches Ziel der vorliegenden Arbeit war es, diese empfindliche und isotopenselektive Technologie erstmals zur Messung von NO aus synthetischen NO-Donoren anzuwenden. Zu diesem Zweck sollte ein geeignetes Verfahren entwickelt werden, das aus Diazeniumdiolaten liberierte NO zu detektieren und aufzuzeichnen.

Die erhaltenen Freisetzungsprofile sollten auf kinetische Gesetzmäßigkeiten der NO-Liberation untersucht und geeignete Parameter (wie Halbwertszeiten und Geschwindigkeitskonstanten), die einen Vergleich der zuvor synthetisierten Diazeniumdiolate zuließen, ermittelt werden. Mit diesen Parametern war die Untersuchung allgemeingültiger Struktur-Freisetzungsbeziehungen verbunden. Im Hinblick auf die Entwicklung eines standardisierten Verfahrens sollten weitere den Freisetzungsverlauf beeinflussende Versuchsbedingungen wie pH und Temperatur sowie methodische Einflussparameter wie Fließgeschwindigkeit und Puffervolumen untersucht werden.

Pharmakologie

Mehrere Aspekte sollten hier untersucht werden.

- Mit dem Ziel das Freisetzungsprofil der NO-Donoren auch in physiologischen Medien zu bestimmen, sollten Liberationsstudien von NO aus Diazeniumdiolaten in Tierblut durchgeführt werden, da Blut nach bisherigen Erkenntnissen sowohl NO speichert, vor allem aber auch metabolisiert. Deshalb war zusätzlich geplant, die wichtigsten Stoffwechselprodukte des freigesetzten NO - Nitrit, Nitrat, S-Nitrosothiole und NO-Hämoglobin-Komplexe - quantitativ zu ermitteln.

-
- Die synthetisierten Verbindungen sollten dem Arbeitskreis von Prof. Fricke in Köln zur Verfügung gestellt werden. An Koronararterien des Hausschweins sollte dort das Zeitprofil der Dilatation im Vergleich zu organischen Nitraten bestimmt werden. Es stellen sich hier die Fragen, ob die Dauer der Relaxation mit der Halbwertszeit der NO-Liberation korreliert und ob die Relaxation möglicherweise reversibel, gewissermaßen in Spiegelung der NO-Liberationskurve verläuft. Weiterhin sollte untersucht werden, ob mit den direkten NO-Donoren wie bei den organischen Nitraten, vor allem GTN, Toleranz auftritt oder nicht.

B Allgemeiner Teil

1. Chemie der Diazeniumdiolate

Die wesentliche Zielsetzung dieser Arbeit war die Synthese sowohl literaturbekannter als auch neuer Diazeniumdiolate, um später mit Hilfe geeigneter analytischer Methoden deren NO-Freisetzungsverhalten zu untersuchen.

In diesem Kapitel sei auf die Chemie der N-Diazeniumdiolate eingegangen, die Durchführung der NONOat-Synthese und die Ergebnisse der synthetischen Arbeit beschrieben. Zunächst ein Überblick über die Literatur dieser Problematik.

1.1. Bekanntes zur Chemie der Diazeniumdiolate

N-Diazeniumdiolate sind Additionsprodukte von Stickstoffmonoxid und Aminen. Sie wurden 1960 erstmals von *Drago et al.* synthetisiert (Drago and Paulik, 1960). Chemisch betrachtet ist die funktionelle Gruppe der NONOate das Anion einer einbasigen Säure (Hrabie and Keefer, 2002). Da die an Stickstoff gebundenen Diazeniumdiolate aber selbst säureempfindlich sind und durch Protonierung zu NO und Amin zerfallen (*Abb. 12*), konnte die O-protonierte Form bisher nicht isoliert werden.

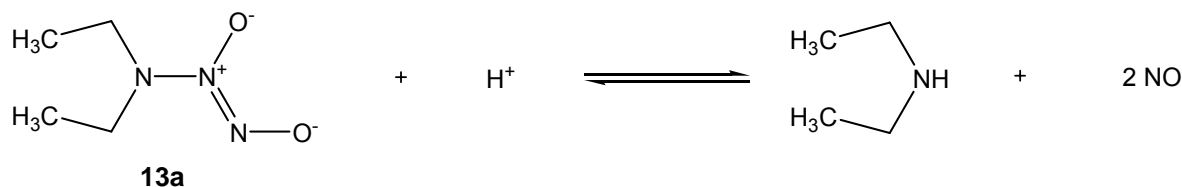


Abb. 12: Durch Protonierung zerfällt DEA/NO (13a) zu NO und Diethylamin.

NONOate werden in der Regel als Alkali- oder Ammoniumsalze dargestellt. Natrium- und Kalium-Ionen stammen von den zur Synthese eingesetzten Basen (Beispiel *Abb. 13 16a*), Ammonium-Ionen von einem zweiten Aminmolekül (Monoaminderivate, Beispiel **16b**) (Saavedra et al., 1997). Bei den zwitterionischen Polyamin-Derivaten handelt es sich um intramolekulare Ammoniumsalze (Beispiel **17**) (Hrabie et al., 1993).

Zur chemischen Charakterisierung der NONOate können verschiedene spektroskopische Methoden, wie IR-, UV- und NMR-Spektroskopie, herangezogen werden. Zur IR-Spektroskopie von NONOaten sind bislang nur wenige Daten veröffentlicht worden. *Drago* berichtet, dass infrarotspektroskopische Messungen (aufgenommen in Nujol) für unsubstituierte N-Diazeniumdiolate drei charakteristische Banden ergeben, von denen zwei auf

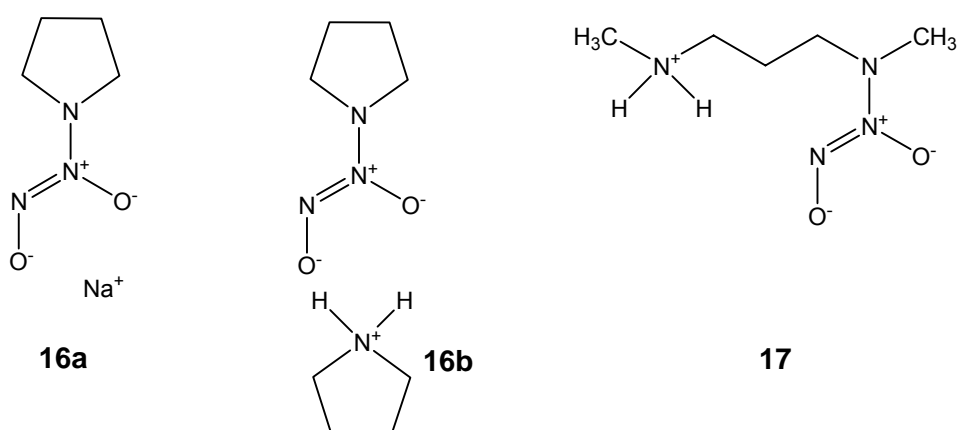
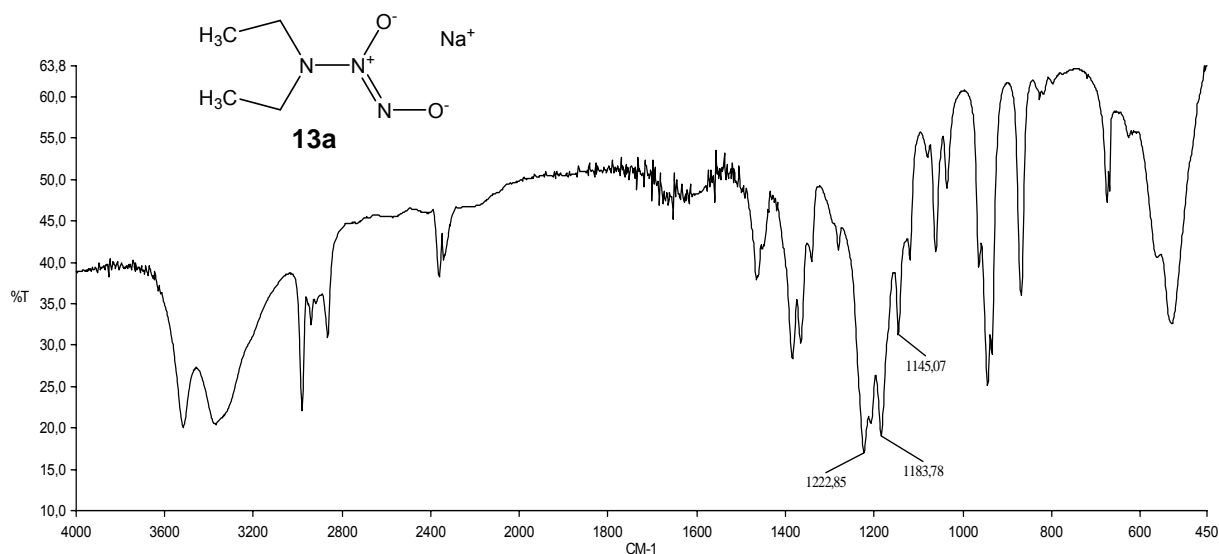


Abb. 13: Diazeniumdiolate.

N-O Valenz- ($1225\text{--}1210\text{ cm}^{-1}$; $1187\text{--}1155\text{ cm}^{-1}$) und eine auf N-N Valenzschwingungen ($1131\text{--}1129\text{ cm}^{-1}$) zurückzuführen sind (Drago and Paulik, 1960). Aufnahmen als KBr-Pressling ergeben für die N-N Valenzschwingungen Wellenzahlen bis 1145 cm^{-1} . Abb. 14 stellt die charakteristischen Banden von DEA/NO (**13a**) dar.

Abb. 14: IR-Spektrum von DEA/NO (**13a**) mit den charakteristischen Banden der $[\text{N}(\text{O})\text{NO}]$ -Gruppe.

Für das UV-Spektrum eines unsubstituierten NONOates - gemessen in basischer Lösung - ist ein Absorptionsmaximum bei 250 nm ($7,2\text{--}9,4\text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) typisch. Die Protonierung der $[\text{N}(\text{O})\text{NO}]$ -Gruppe bewirkt eine hypsochrome Verschiebung zu 230 nm , die Alkylierung des terminalen Sauerstoffs eine Verschiebung zu 235 nm .

Die in dieser Arbeit synthetisierten Diazeniumdiolate werden in erster Linie NMR-spektroskopisch charakterisiert (siehe Kapitel 1.2.3.).

1.1.1. Stabilität und Lagerung der Diazeniumdiolate

Abhängig von der molekularen Struktur variiert die Stabilität der Diazeniumdiolate. Bimolekulare Ammoniumsalze wie **16b** sind extrem hygroskopisch und daher instabil (Drago and Karstetter, 1961). Zwitterionische Polyamin-Derivate und Alkalisalze dagegen bleiben bei sachgerechter Lagerung über Jahre beständig. Nach *Keefer* sollen Diazeniumdiolate vor Licht, Feuchtigkeit und Luftsauerstoff geschützt bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt werden (Keefer, Nims, Davies, and Wink, 1996). Die Gefäße werden mit trockenem Stickstoff oder Argon gespült und anschließend versiegelt. PARAFILM® eignete sich gut für die Versiegelung der Behältnisse. NONOate sind in der Regel weiße Pulver mit guten Fließeigenschaften. Verfärbungen oder Verklumpungen, die im Verlauf der Lagerung auftreten, können Anzeichen einer beginnenden Zersetzung sein. Typische Zersetzungsprodukte der Diazeniumdiolate sind Nitrosamine sowie anorganische Nitrite und Nitrate.

Diazeniumdiolate sind aufgrund ihres ionischen bzw. zwitterionischen Charakters gut wasserlöslich. Die Stabilität von wässrigen NONOat-Lösungen ist von verschiedenen Faktoren abhängig. In der Literatur wurde am Beispiel des PROLI/NO (**16c**) die Licht-, Protonen- und Sauerstoffempfindlichkeit der gelösten anionischen Diazeniumdiolate untersucht (Srinivasan et al., 2001). Während in der Dunkelheit überwiegend eine protonenkatalysierte Dissoziation mit anschließender Oxidation des Stickstoffmonoxids zu Nitrit zu beobachten ist (*Abb. 15a*), ereignet sich unter UV-Licht eine photolytische Spaltung des NONOates zum Nitrosamin und Nitroxylanion (*Abb. 15b*). Letzteres wird durch Sauerstoff über Peroxynitrit zu Nitrat oxidiert. Dementsprechend ist die Nitratkonzentration einer dem Sonnenlicht ausgesetzten Probe um ein vielfaches erhöht.

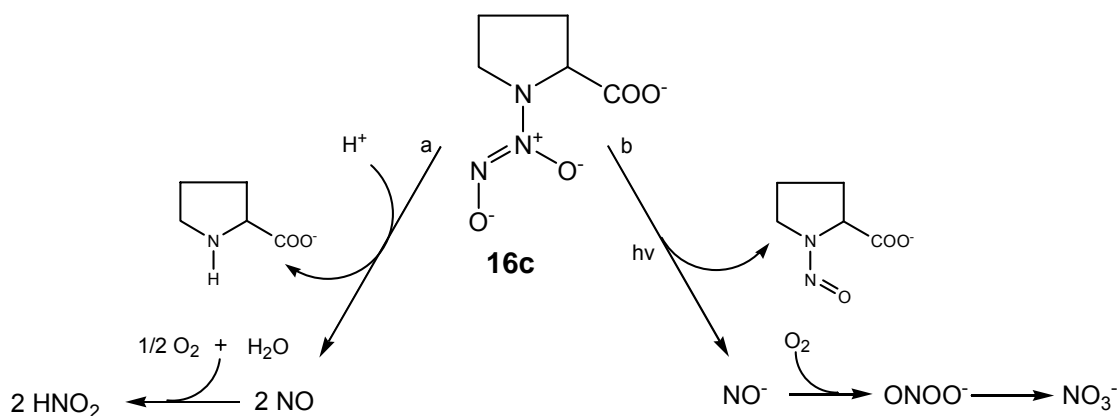


Abb. 15: Zersetzung von PROLI/NO (**16c**) unter sauren Bedingungen (a) und im UV-Licht (b).

Die Stabilität der wässrigen Lösungen nimmt mit steigendem pH-Wert zu. Stamm- und Probenlösungen werden daher mit 0.01 M Natronlauge hergestellt und können mehrere Tage im Kühlschrank aufbewahrt werden (Keefer, Nims, Davies, and Wink, 1996).

1.1.2. *Zerfallskinetik und NO-Freisetzung aus Diazeniumdiolaten*

Werden N-Diazeniumdiolate in wässrigen, nicht-basischen Medien - wie Blut, Zellkulturen oder Pufferlösungen - gelöst, dissoziieren sie gemäß *Abb. 12* zu NO und Amin. Die Dissoziationsreaktion der NONOate folgt einem Zeitgesetz (pseudo)erster Ordnung, wobei die Geschwindigkeitskonstante abhängig ist von pH und Temperatur der Lösung (Davies et al., 2001).

Wie der Zerfall der NONOate zeigt auch das Freisetzungsprofil des Stickstoffmonoxids einen exponentiellen Verlauf. Durch dessen Aufzeichnung mittels LMRS können daher Geschwindigkeitskonstanten sowie Zerfallshalbwertszeiten der NONOate berechnet werden (Horstmann et al., 2002). Im Kapitel 2.6. wird die Berechnung der Zeitkonstanten ausführlich besprochen.

1.1.3. *Nitrosaminbildung bei der Dissoziation von Diazeniumdiolaten*

Bei der Dissoziation von Diazeniumdiolaten in wässrigen Medien kommt es neben der erwünschten NO-Liberation auch zur Bildung geringer Mengen N-Nitrosamine (Hansen et al., 1982). Das Auftreten kanzerogener Nitrosamine schränkt die therapeutische Anwendung der NONOate erheblich ein. Wie *Abb. 16* zeigt, entstehen Nitrosamine nicht durch die direkte Oxidation der $[N(O)NO]^-$ -Gruppe, sondern erst nach Freisetzung von Stickstoffmonoxid durch die Bildung nitrosierender Spezies.

1.1.4. *Synthese von Diazeniumdiolaten*

Nur wenige Arbeitsgruppen haben sich in der Vergangenheit mit der Synthese von Diazeniumdiolaten beschäftigt. Die von *Drago* erstmals beschriebene Methode zur Darstellung der NO-Donoren wurde später von *Keefer* und *Saavedra* weiterentwickelt. Die Synthese verläuft grundsätzlich nach dem folgenden Prinzip: ein geeignetes Nukleophil wird mit Stickstoffmonoxid unter erhöhtem Druck zur Reaktion gebracht, wobei *Drago* anfangs bei Temperaturen von 78°C, *Keefer* später bei Zimmertemperatur arbeitete (Keefer, Nims, Davies, and Wink, 1996).

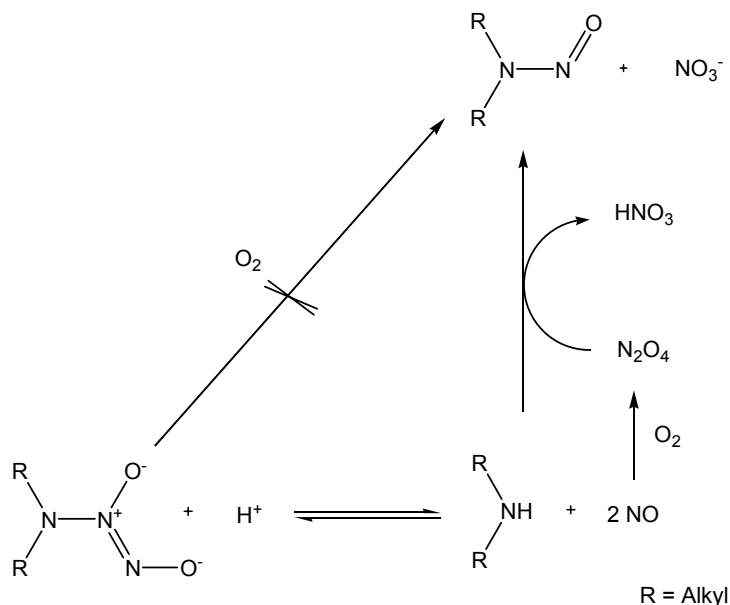


Abb. 16: Nitrosaminbildung bei der Dissoziation von NONOaten nach Keefer (Keefer, 1998).

Die Addition von NO an sekundäre Amine verläuft in mehreren Schritten (Abb. 17). Die Reaktion wird durch den nukleophilen Angriff eines sekundären Amins (I) auf ein Molekül Stickstoffmonoxid (II) initiiert. Erst im nachfolgenden Schritt kommt es zur Addition eines zweiten NO-Moleküls (III) an IV. Durch den Einsatz einer starken Base wird V zu VI deprotoniert. Edukte und Produkte stehen zwar im Gleichgewicht miteinander, das entstehende NONOat fällt jedoch aus und wird so dem Gleichgewicht entzogen, was als treibende Kraft der Reaktion angesehen werden kann (Zhang et al., 2003).

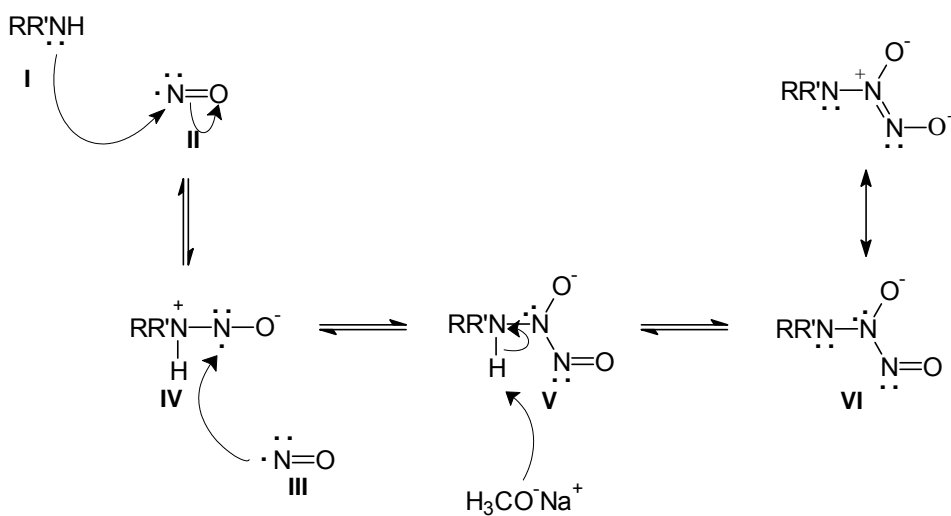


Abb. 17: Reaktionsmechanismus der Diazeniumdiolat-Synthese (Zhang, Annich, Miskulin, Stankiewicz, Osterholzer, Merz, Bartlett, and Meyerhoff, 2003).

1.1.5. Nebenprodukte der Diazeniumdiolat-Synthese

Stickstoffmonoxid ist ein hochreaktives Radikal. Daher treten bei der Synthese neben der Bildung von Nitrosaminen (wie in Abb. 16) weitere, konkurrierende Reaktionen auf, die zur Verunreinigung der NONOate führen. Schon geringe Mengen Luftsauerstoff und Wasser führen beispielsweise zur Bildung von substituierten Ammoniumnitriten (Abb. 18). Nitrosamin- und Nitritbildung können im Hinblick auf Hygroskopie und Oxidationsempfindlichkeit der NONOate auch nach der Synthese - insbesondere bei nicht sachgerechter Lagerung - auftreten.

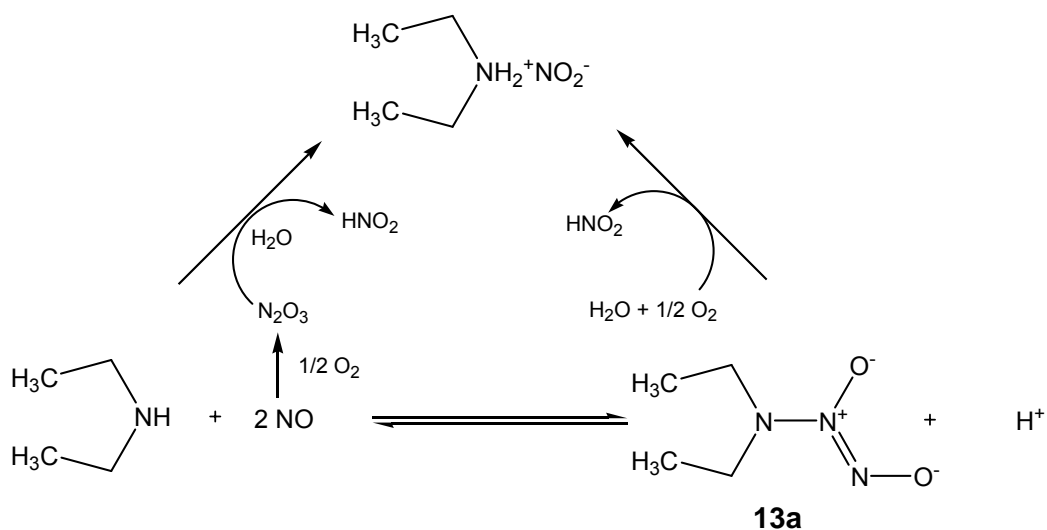


Abb. 18: Bildung von Ammoniumnitrit bei Synthese und Lagerung von NONOaten.

Auch eingesetzte Lösungsmittel und Basen können mit NO reagieren und die gewünschten Diazeniumdiolate verunreinigen. So reagiert das häufig bei der NONOat-Synthese eingesetzte Acetonitril mit NO in Gegenwart von starken Basen zu einem Polydiazeniumdiolat **18** (Abb. 19) (Arnold et al., 2002).

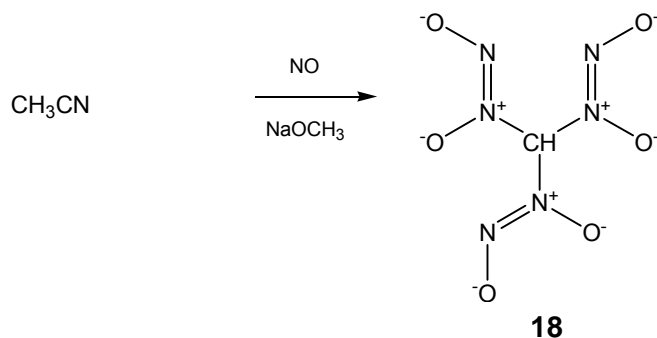


Abb. 19: Bildung des Polydiazeniumdiolats **18** als Nebenprodukt des NONOat-Synthese.

Natriumethanolat eignet sich nicht als Base für die NONOat-Synthese, da es in Gegenwart von NO zu einem C-ständigen Diazeniumdiolat abgebaut wird (Traube-Abbau) (Keefer et al., 2001). Die Reaktion wird durch die Oxidation von Ethanolat zu Acetaldehyd initiiert, das dann aufgrund seiner CH-Azidität mit NO zu **19** und dann in Gegenwart starker Basen zum Traube-Produkt (**20**) reagiert.

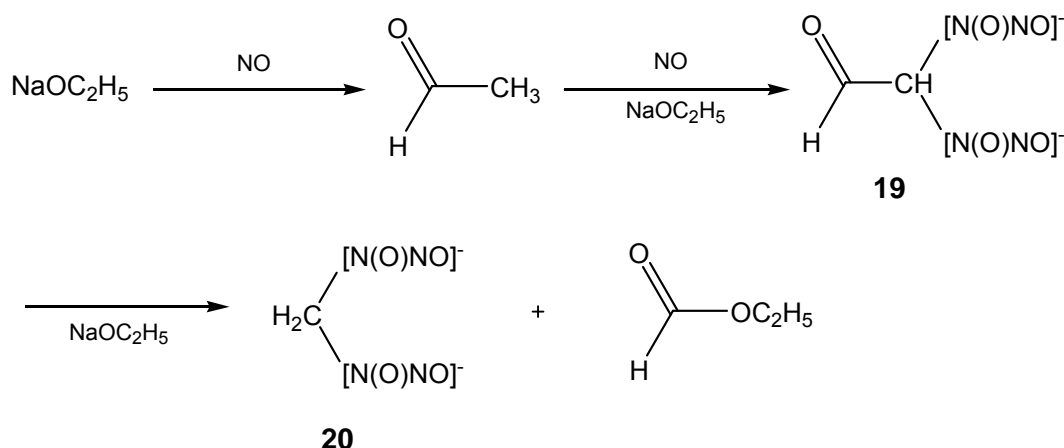


Abb. 20: Traube-Abbau von Natriumethanolat.

1.2. Darstellung 1-substituierter Diazeniumdiolate

Die Synthese der NONOate erfolgt durch Belastung eines sekundären Amins mit Stickstoffmonoxid unter erhöhtem Druck in einer geeigneten Apparatur. Die Anwendung des hochreaktiven NO unter Ausschluss von Sauerstoff stellt hohe Anforderungen an den experimentellen Aufbau. Daher beschäftigt sich folgendes Kapitel mit Aufbau und Methode der NONOat-Synthese.

1.2.1. Aufbau der Syntheseapparatur

Nachfolgend sind einige wichtige Anforderungen an die Apparatur zur Synthese von Diazeniumdiolaten aufgelistet:

- Die Apparatur soll dicht, evakuierbar und inert gegenüber Stickstoffmonoxid sein.
- In der Reaktionszelle sollte auch eine Temperaturmessung möglich sein (einige Reaktionen können stark exotherm verlaufen (Drago and Paulik, 1960)).
- Eine Spülvorrichtung mit einem Inertgas ist notwendig, um Druckregler und System zu schützen.
- Bei Überdruck muss eine schnelle Lüftung der Apparatur durchführbar sein.

- Die Anlage muss im Abzug stehen, da freiwerdendes NO mit Luftsauerstoff toxische nitrose Gase bildet.

Abb. 21 zeigt die schematische Darstellung der ersten von uns entwickelten Syntheseapparatur.

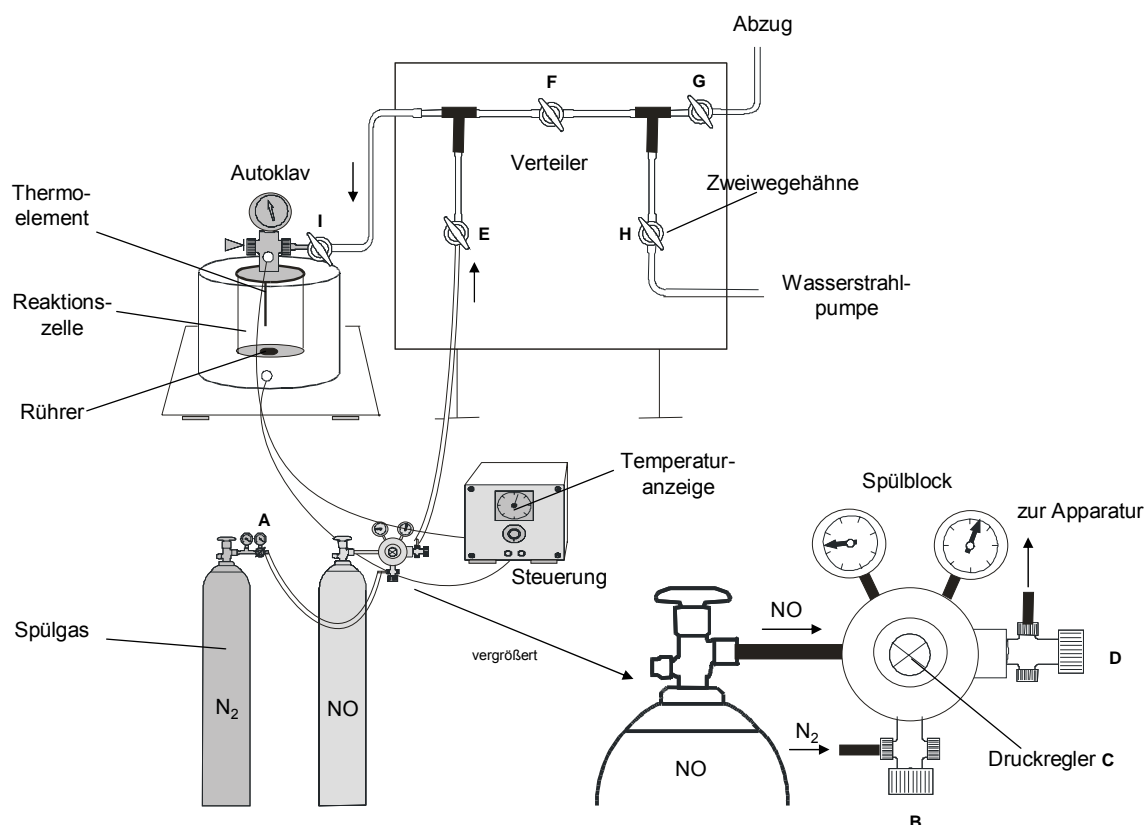


Abb. 21: Apparatur zur Synthese von Diazoniumdiolaten. Vergrößert: Spülblock der NO-Druckflasche.

Die teflonbeschichtete Reaktionszelle mit Rührer befindet sich in einem Autoklaven, der über ein Manometer, eine externe Rührsteuerung und ein Thermoelement zur Temperaturanzeige verfügt. Über ein Nadelventil (I) ist er mit dem Gasleitungssystem (Verteiler), das auf eine Holzplatte geschraubt ist, verbunden. Rohre und Zweiwegehähne des Systems bestehen aus Edelstahl, Verbindungsschläuche aus PVC. Alle Verbindungen sind mit Teflondichtungen versehen. Der Verteiler verbindet zuführendes und ableitendes System mit der Reaktionszelle. Das zuführende System besteht aus zwei hintereinander geschalteten Stahlgasflaschen. Die erste Gasflasche enthält ein inertes Spülgas (Stickstoff) und ist über einen Druckregler (A) direkt an den Spülblock (Spülblock SBM/3 mit Druckregler für Feinstgase der Firma *Messer Griesheim*[®]) der NO-Gasflasche angeschlossen. Über das Hauptventil (D) des Spülblocks, der in Abb. 21 vergrößert abgebildet ist, kann sowohl das Spülgas als auch Stickstoffmonoxid in

das System geleitet werden. Über den Druckregler (**C**) kann der gewünschte Systemdruck eingestellt werden.

Das ableitende System besteht aus der Wasserstrahlpumpe und der Lüftung. Da die Abwesenheit von Luftsauerstoff für die NONOat-Synthese Voraussetzung ist, muss neben der Spülvorrichtung eine Möglichkeit zur Evakuierung gegeben sein. Membranpumpen kommen dafür nicht in Frage, da sie innerhalb kürzester Zeit durch den Einfluss von NO erodieren würden. Somit steht für die Evakuierung nur eine über eine Vakuumflasche mit der Apparatur verbundene Wasserstrahlpumpe zur Verfügung. Die Vakuumflasche (nicht abgebildet) ist mit einem Manometer ausgerüstet, mit dessen Hilfe der Evakuierungsvorgang bequem verfolgt werden kann.

Zur Lüftung wird aus Sicherheitsgründen über einen weiteren Zweiwegehahn (**G**) eine direkte Verbindung zum Abluftschacht des Abzuges geschaffen. Nach Beendigung der Versuche können so große Mengen nitroser Gase in den Schacht geleitet werden, bevor man über die Wasserstrahlpumpe restliche Gasspuren entfernt.

1.2.2. Durchführung der Synthese

Herstellung der Aminlösung

Das sekundäre Amin muss zunächst gelöst werden (einige Feststoffe liegen lediglich suspendiert vor, lösen sich aber spätestens nach Zugabe der Basenlösung auf). Geeignete Lösungsmittel sind Methanol, das vor allem bei polaren Edukten (wie z.B. Aminosäuren) zur Anwendung kommt, THF, Diethylether und Acetonitril. Letzteres ist nach neueren Erkenntnissen nicht inert und reagiert in Gegenwart von starken Basen mit NO zu **18** (siehe Kapitel 1.1.5.).

Allerdings lassen sich viele NONOate gerade in Acetonitril gut darstellen. Gute Ausbeuten werden beispielsweise mit einer Mischung aus CH₃CN und Diethylether im Verhältnis 1:1 erzielt. Ein alleiniger Einsatz von Et₂O ist dagegen nicht geeignet. Daher gilt: Lösungsmittel der ersten Wahl ist Methanol. Lässt sich ein Diazeniumdiolat in Methanol nicht darstellen, wird eine CH₃CN/Diethylether Mischung verwendet.

Flüssige sekundäre Amine sowie alle Lösungsmittel sollten vor Gebrauch destilliert und getrocknet werden.

Herstellung der Basenlösung

Bei der Synthese der Natrium-Diazeniumdiolate dient Natriummethanolat als Base. Zur Herstellung der Basenlösung wird in einem Eisbad NaOCH₃ oder elementares Natrium in

Methanol gelöst (Vorsicht H_2 -Entwicklung!). Bequemer ist allerdings die Anwendung einer käuflich zu erwerbenden Fertiglösung von $NaOCH_3$ in MeOH (30% [m/m]; erhältlich bei FLUKA®).

Herstellung der Reaktionslösung

Die erhaltenen Lösungen werden so zusammengefügt, dass in der Reaktionslösung Amin und Base in einem molaren Verhältnis von 1:1 (bei Aminosäuren 1:2) enthalten sind (als Beispiel sei hier die Herstellung von DEA/NO genannt: 0.2 mol Diethylamin in 100 ml Et_2O/H_3CCN und 0.2 mol $NaOCH_3$ in 50 ml MeOH).

Das Volumen des Lösungsmittel ist so zu wählen, dass das Teflongefäß des Autoklaven nicht mehr als dreiviertel gefüllt ist. Ein zu hoch gefülltes Gefäß kann bei der Evakuierung des Systems zu einem Übertreten des Lösungsmittels in das gaszuleitende System führen.

Die klare Reaktionslösung wird in das Teflongefäß gegeben, der Autoklav dicht verschlossen. Anschließend werden Rührer und Temperaturanzeige aktiviert (Synthesen von NONOaten verlaufen initial leicht exotherm). Der Rührer wird auf ca. 500 Umdrehungen pro Minute eingestellt.

NO-Einleitung

Vor der Einleitung des Stickstoffmonoxids wird die gesamte Apparatur mit Hilfe der Wasserstrahlpumpe evakuiert und dann mit Stickstoff sorgfältig gespült. Es wird vorgeschlagen, Evakuierung und Spülung vor jeder Synthese jeweils dreimal durchzuführen. Nach der Evakuierung werden die Ventile zu Wasserstrahlpumpe, Abzug und Spülgasflasche geschlossen und die Ventile des zuleitenden Systems geöffnet. Dann wird das Ventil der NO-Gasflasche vorsichtig geöffnet und die Reaktionslösung im Autoklaven mit 3 bar NO 24 bis 72 Stunden belastet.

Beenden der NO-Einleitung und Lüftung der Apparatur

Nach Beendigung der Reaktion wird zunächst überschüssiges Stickstoffmonoxid in den Abluftschacht des Abzugs geleitet. Danach werden mit der Wasserstrahlpumpe die Gasrückstände entfernt. Zur Sicherheit wird auch nach der NO-Belastung die Apparatur mehrmals mit Stickstoff gespült. Auf diese Weise kann das Austreten von nitrosen Gasen nach dem Öffnen der Apparatur verhindert und Apparatur und Spülblock vor Korrosion geschützt werden.

Aufarbeitung der Diazeniumdiolate

Die Diazeniumdiolate fallen in der Regel als voluminöser, weißer Niederschlag aus. Wird Methanol als Lösungsmittel verwendet, muss zur Fällung gelegentlich Diethylether hinzugefügt werden.

Die NONOate werden abgesaugt und zuerst mit Mutterlauge, dann mit trockenem Diethylether mehrmals gewaschen. Angesichts der grundsätzlichen Hygroskopie der NONOate muss der Aufarbeitungsvorgang zügig durchgeführt werden. Vor allem **21i** (!), **21k** und **22** sind sehr hygroskopisch.

In der Trockenpistole werden die Produkte über mehrere Stunden i. Vak. (10 mbar) getrocknet. Selbst durch langes Trocknen (Ölpumpe) können Lösungsmittel- und Wasserrückstände oft nicht vollständig entfernt werden. Nach der Trocknung verbleibt ein grobes Granulat, das im Mörser pulverisiert werden kann. Bei sehr hygroskopischen Diazeniumdiolaten ist es ratsam, sie in der Granulatform zu belassen. Durch die geringere Oberfläche ist es dadurch möglich, sie über einen längeren Zeitraum zu lagern (zur Lagerung siehe Kapitel 1.1.).

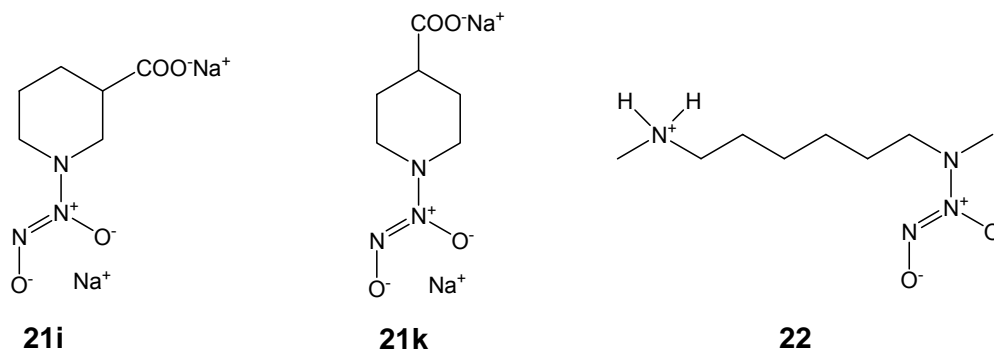


Abb. 22: Diazeniumdiolate mit ausgeprägter Hygroskopie.

1.2.3. Synthese der Zielverbindungen

Die Diazeniumdiolate der Piperidinreihe können chemisch in zwei Gruppen unterteilt werden. Die erste Gruppe leitet sich von ein- bis mehrfach alkylierten Piperidinderivaten ab (**21a-f**). Für die zweite Gruppe wurden die α -, β - und γ -Piperidincarbonsäuren zu NONOaten umgesetzt (**21g-k**). In Tab. 1 sind wesentliche Daten zu den synthetisierten Piperidinderivaten zusammengefasst.

Alkylierte Piperidinderivate

Die alkylierten Piperidinderivate wurden wie in Kapitel 1.2.2. beschrieben synthetisiert. Als Base wurde Natriummethanolat in äquimolaren Mengen eingesetzt. CH_3CN und Et_2O dienten als Lösungsmittel für die Edukte.

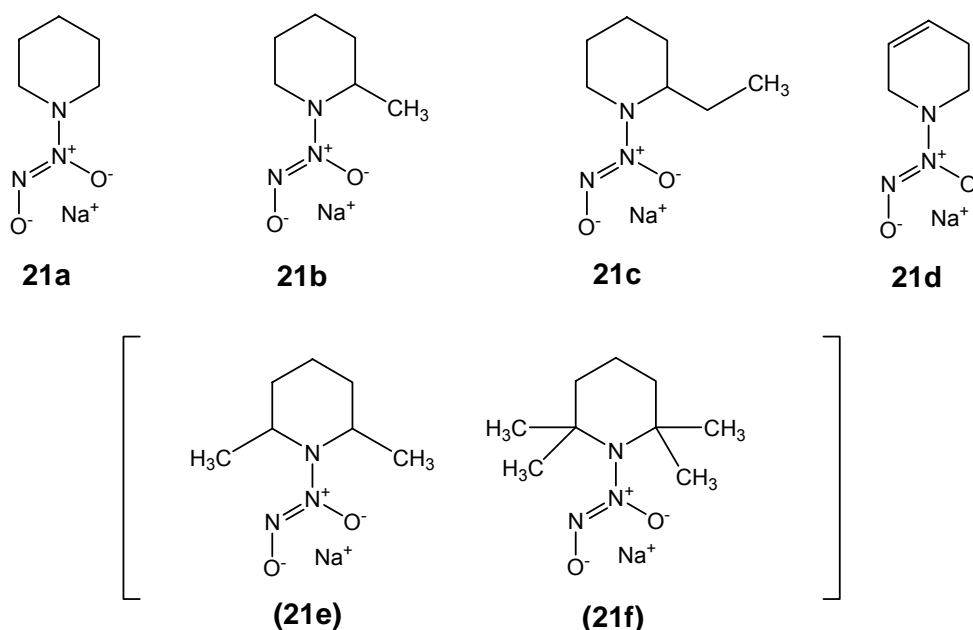


Abb. 23: Alkylierte Piperidinderivate (**21e** und **21f** konnten nicht dargestellt werden).

Nach der NO-Belastung konnte bei allen Ansätzen weiße, pulverförmige Niederschläge isoliert werden. Die Synthesen von **21a-d** erbrachten akzeptable Ausbeuten (Tab. 1), die Syntheseveruche von **21e** und **21f** dagegen lieferten eine auffallend geringe Menge an isoliertem Feststoff. Die analytischen Daten zeigen: während das unsubstituierte **21a** und die monoalkylierten **21b** und **21c** mit NO zu den erwünschten Zielverbindungen umgesetzt werden konnten, gelang die Synthese der mehrfach substituierten **21e** und **21f** nicht. Im IR-Spektrum der isolierten Feststoffe (Abb. 24) fehlen die typischen CH-Valenz-Banden ($2925\text{--}2940\text{ cm}^{-1}$; $2855\text{--}2850\text{ cm}^{-1}$) des Piperidinrings sowie die für NONOate charakteristischen N-N-Valenzbanden ($1131\text{--}1145\text{ cm}^{-1}$). Fehlende Signale im ^1H -NMR-Spektrum und stark erniedrigte Werte für Kohlenstoff in der EA weisen auf anorganische Verbindungen wie Nitrite und Nitrate hin.

Die sterische Abschirmung gegenüber dem angreifenden NO-Molekül bei **21e** und **21f** verhindert demnach die NONOat-Synthese, wobei parallele Redoxreaktionen weiterhin ablaufen und so zur Bildung der isolierten Feststoffe führen.

Im Gegensatz dazu reicht eine Monoalkylierung nicht aus, die Addition von NO an die Aminogruppe vollständig zu verhindern. Allerdings zeigen analytische Daten in der Reihenfolge **21a**, **21b**, **21c** eine zunehmende Verunreinigung der synthetisierten Verbindungen. Vermutlich behindert auch eine Monoalkylierung die NONOat-Synthese und begünstigt damit Konkurrenzreaktionen wie die Bildung anorganischer Nitrite und Nitrate.

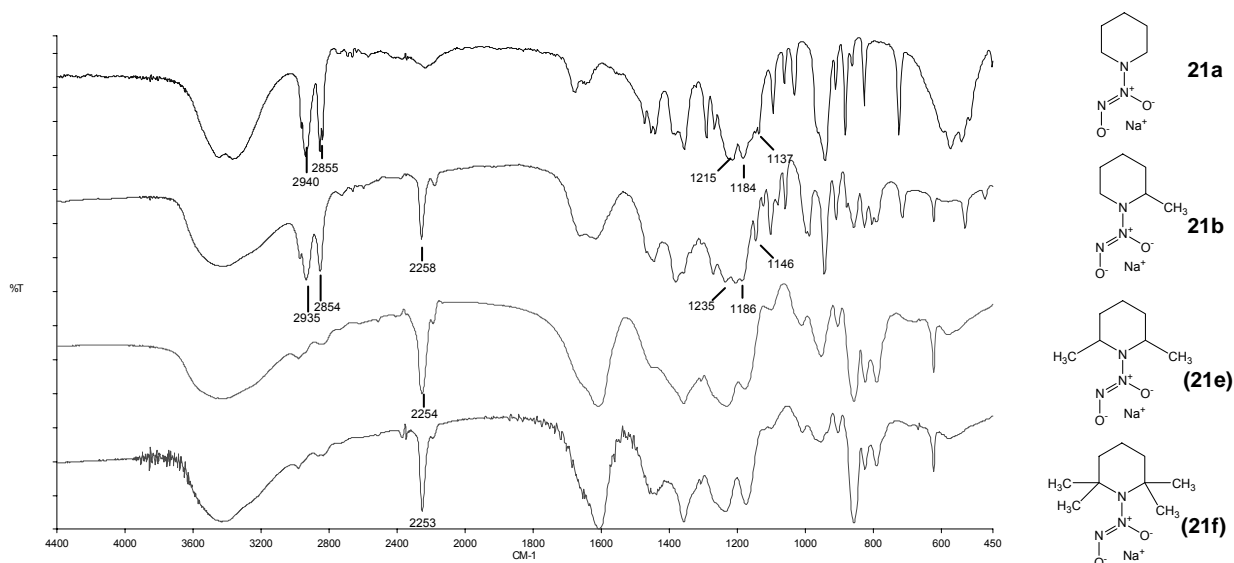


Abb. 24: IR-Spektren von **21a**, **b**, **e** und **f** (von oben).

Abb. 25 zeigt exemplarisch das in D₂O vermessene H-NMR-Spektrum von **21c**. Die [N(O)NO]⁻-Gruppe bewirkt eine Entschirmung der Protonen der benachbarten Kohlenstoffatome. Diese sind gegenüber den Protonen des Eduktes ins Tieffeld verschoben (ca. 0.5 ppm). Eine solche Tieffeldverschiebung ist charakteristisch für Diazeniumdiolate und ein wichtiger Nachweis für ihre Identität (siehe auch Abb. 29).

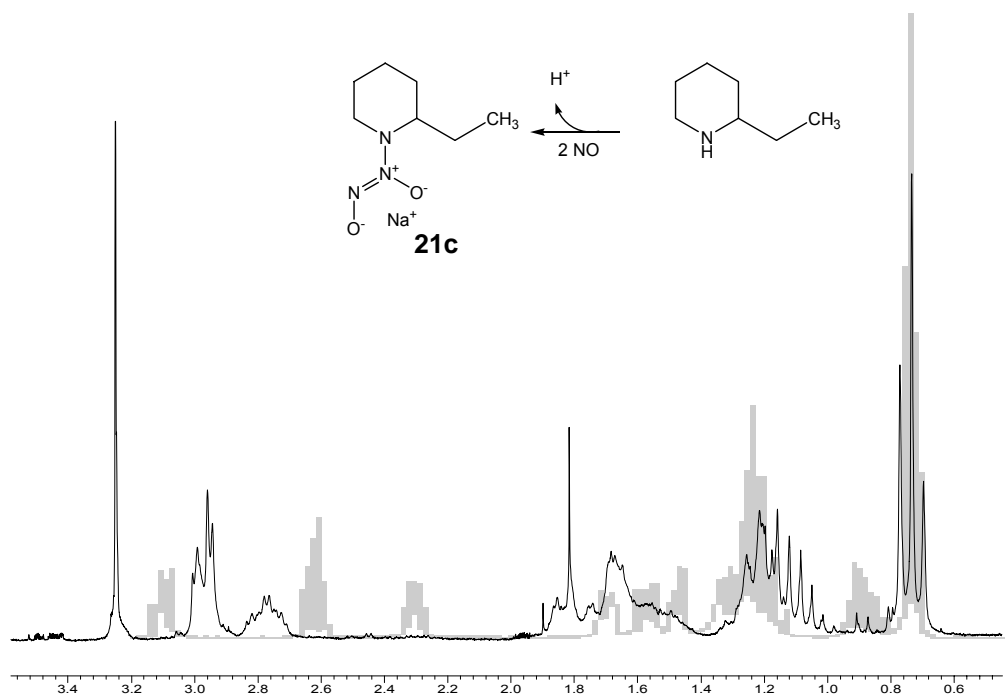


Abb. 25: ¹H-NMR-Spektrum von **21c** und 2-Ethylpiperidin (Hintergrund).

Abb. 26 zeigt die chemischen Verschiebungen der erhaltenen Diazeniumdiolate alkylierter Piperidine.

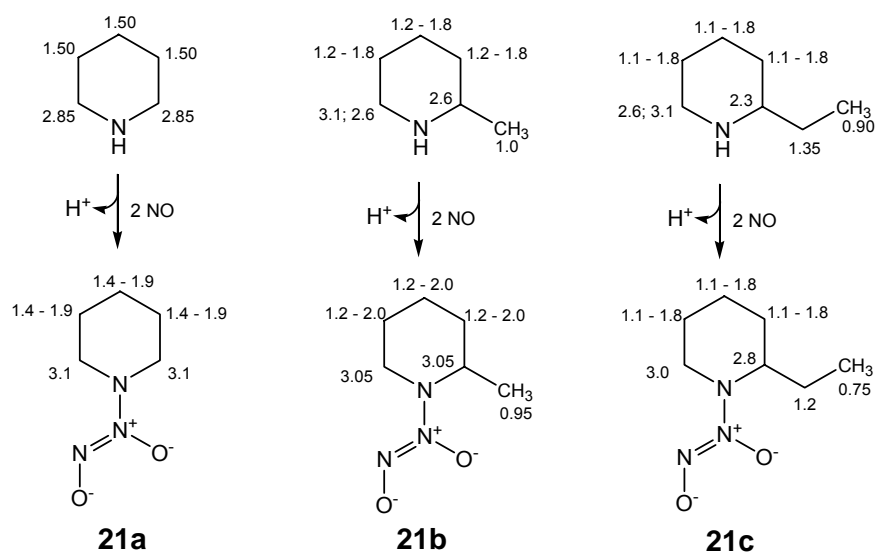
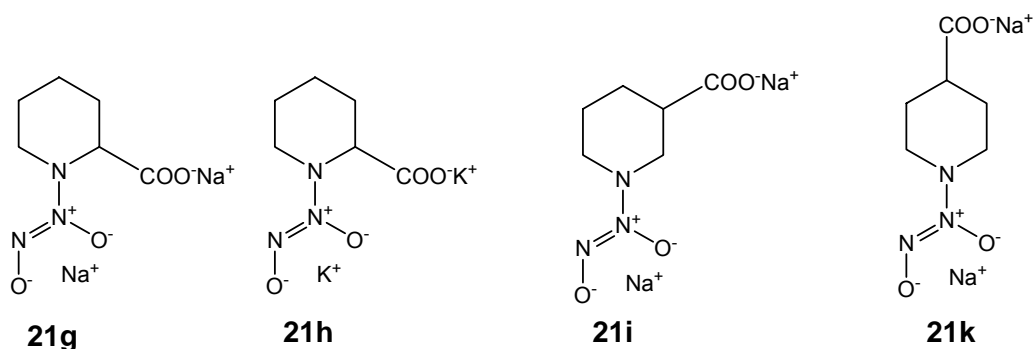


Abb. 26: Chemische Verschiebung der alkylierten Piperidinderivate im ¹H-NMR-Spektrum.

Carboxylierte Piperidinderivate

Bedingt durch die Säuregruppe wurden bei der Synthese der α-, β- und γ-Piperidincarbonsäuren Amin und Base im Verhältnis 1:2 eingesetzt. MeOH diente als Lösungsmittel für die Edukte. Präparative Daten können Tab. 1 entnommen werden.



Eine Carboxylgruppe am Piperidinring behindert die Addition von Stickstoffmonoxid nicht. Im Gegenteil: Diazeniumdiolate von 2-, 3- und 4-Carboxypiperidin (**21g-k**) lassen sich im Gegensatz zu höher alkylierten Derivaten problemlos und mit hohen Ausbeuten synthetisieren. Die Hygroskopie innerhalb dieser Gruppe ist stark ausgeprägt. Vor allem **21i** zieht innerhalb kürzester Zeit Wasser. Der durch die Luftfeuchtigkeit initiierte Zersetzungsprozess macht die Lagerung aber auch die Analytik dieser Substanz schwierig.

Der Austausch des Gegenions bei **21h** hat keinerlei Einfluss auf den Syntheseverlauf des NONOates.

Abb. 27 zeigt exemplarisch das ^1H -NMR-Spektrum von **21i** in D_2O (im Vergleich mit dem Edukt). Die Betain-Struktur der Aminosäure in wässriger Lösung bewirkt beim Edukt eine Tieffeldverschiebung der dem positiv geladenen Stickstoff benachbarten Protonen. Durch die Addition von NO fällt die positive Ladung weg, die Tieffeldverschiebung durch die $[\text{N}(\text{O})\text{NO}]^-$ -Gruppe ist jedoch weniger stark ausgeprägt. Daher führt hier die NONOat-Synthese im Vergleich der Spektren sogar zu einer Hochfeldverschiebung der Protonen.

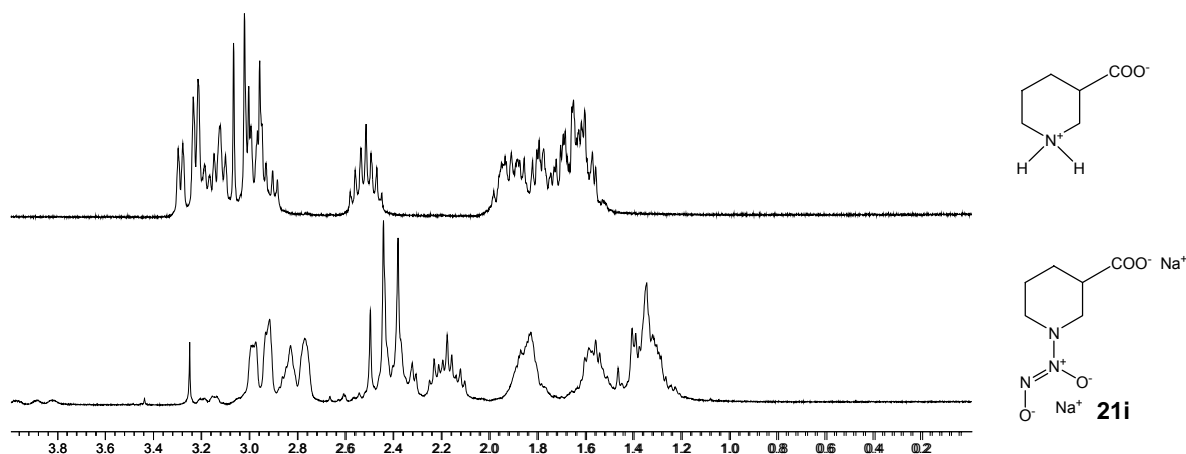


Abb. 27: ^1H -NMR-Spektrum von **21i** und Ausgangsamin in D_2O .

Abb. 28 zeigt die chemischen Verschiebungen im ^1H -NMR-Spektrum (D_2O) der Verbindungen **21g**, **21i** und **21k**.

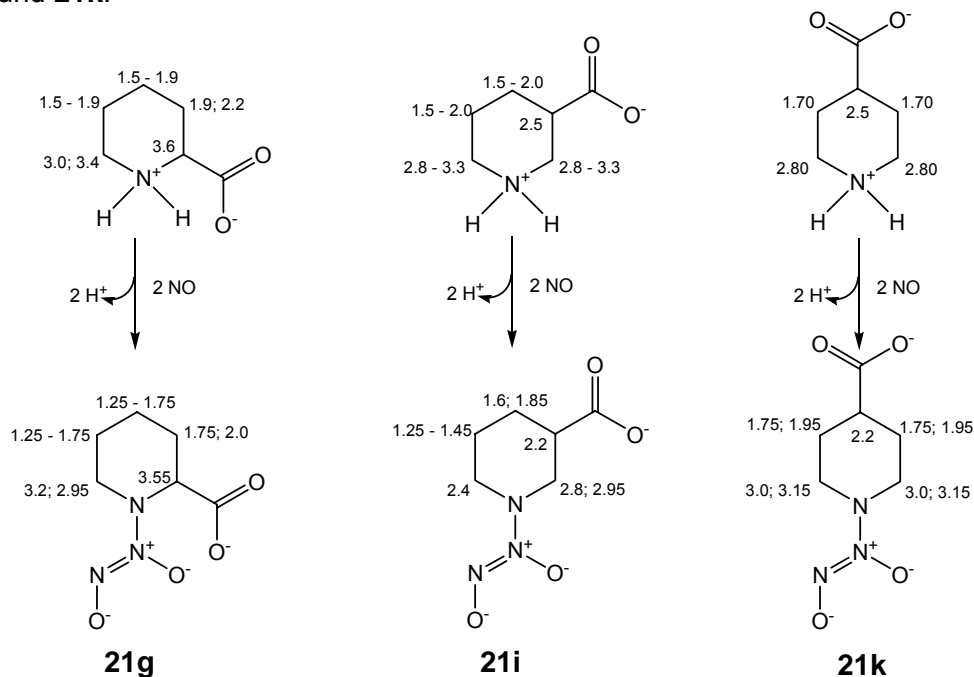
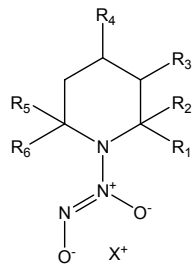


Abb. 28: Chemische Verschiebungen von **21g**, **21i** und **21k** im Vergleich zu ihren Ausgangsaminen.

Tab. 1: Präparative Daten der Piperidin-Reihe.



21

Subst. Nr.	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	X ⁺	Ansatz (Edukt)	LM	Ansatz (Base)	LM	T	Ausbeute [%]	Produkt
21a	H	H	H	H	H	H	Na	0,06	15 ml Et ₂ O / 15 ml CH ₃ CN	0,06	10 ml MeOH	48 h	42	analysenrein
21b	CH ₃	H	H	H	H	H	Na	0,1	25 ml Et ₂ O / 25 ml CH ₃ CN	0,1	20 ml MeOH	60 h	26	Kristallwasser und Lösungsmittel enthalten
21c	C ₂ H ₅	H	H	H	H	H	Na	0,1	50 ml CH ₃ CN	0,1	20 ml MeOH	24 h	21	stark verunreinigt durch anorganisches NO ₂ /NO ₃ ⁻
21d	H	H	-	-	H	H	Na	0,01	15 ml Et ₂ O / 15 ml CH ₃ CN	0,01	10 ml MeOH	24 h	30	Kristallwasser und Lösungsmittel enthalten
21e	CH ₃	H	H	H	H	CH ₃	Na	0,06	15 ml Et ₂ O / 15 ml CH ₃ CN	0,06	10 ml MeOH	48 h	12	Darstellung des NONOates nicht möglich
21f	CH ₃	CH ₃	H	H	CH ₃	CH ₃	Na	0,06	15 ml Et ₂ O / 15 ml CH ₃ CN	0,06	10 ml MeOH	48 h	11	Darstellung des NONOates nicht möglich
21g	COO ⁻	H	H	H	H	H	2 Na	0,1	40 ml MeOH	0,2	40 ml MeOH	48 h	41	Lösungsmittel enthalten
21h	COO ⁻	H	H	H	H	H	2 K	0,04	40 ml MeOH	0,08	40 ml MeOH	72 h	57	analysenrein
21i	H	H	COO ⁻	H	H	H	2 Na	0,1	40 ml MeOH	0,2	40 ml MeOH	48 h	31	sehr hygroskopisch
21k	H	H	H	COO ⁻	H	H	2 Na	0,1	40 ml MeOH	0,2	40 ml MeOH	48 h	30	hygroskopisch

Pyrrolidinderivate

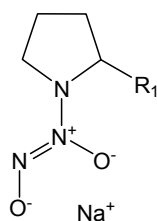
Die Pyrrolidinderivate PYRRO/NO (**16a**) und PROLI/NO (**16c**) wurden nach Literaturangaben dargestellt (Saavedra, Billiar, Williams, Kim, Watkins, and Keefer, 1997), (Saavedra et al., 1996). Beide Verbindungen konnten in der Apparatur (Abb. 21) mit hohen Ausbeuten präpariert werden. Die analytischen und präparativen Daten, die in Tab. 2 dargestellt sind, bestätigen die von Saavedra gefundenen.

Prolin - Edukt von PROLI/NO - liegt wie die carboxylierten Piperidinderivate in wässriger Lösung als Betain vor. Daher ist im ^1H -NMR-Spektrum (D_2O) ebenfalls keine charakteristische Verschiebung ins Tieffeld zu beobachten.

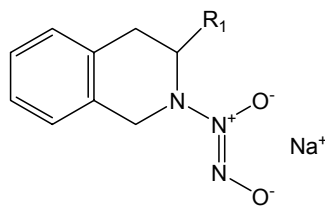
Tetrahydroisochinolininderivate

Amin und Base wurden im Verhältnis 1:2 eingesetzt. Et_2O und CH_3CN (**23a**) bzw. MeOH (**23b**) dienten als Lösungsmittel für die Edukte. In Tab. 2 sind die wesentlichen

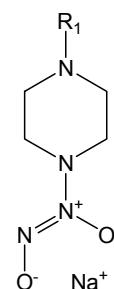
Tab. 2: Präparative Daten der Pyrrolidin-, Tetrahydroisochinolin- und Piperazin-Reihen.



16



23



24

Subst. Nr.	R1	Ansatz (Edukt)	LM (Edukt)	Ansatz (Base)	LM (Base)	t	Ausbeute [%]	Produkt
16a	H	0,2	50 ml Et_2O / 50 ml CH_3CN	0,2	50 ml MeOH	48 h	69	Kristallwasser enthalten
16c	COO^-	0,01	40 ml MeOH	0,01	10 ml MeOH	36 h	38	Kristallwasser und Lösungsmittel enthalten
23a	H	0,03	15 ml Et_2O / 15 ml CH_3CN	0,03	10 ml MeOH	24 h	61	verunreinigt durch anorganische Nitrite und Nitrate
23b	COO^-	0,01	40 ml MeOH	0,02	10 ml MeOH	24 h	21	verunreinigt durch Edukt; Lösungsmittel enthalten
24a	CH_3	0,2	50 ml Et_2O / 50 ml CH_3CN	0,2	50 ml MeOH	24 h	12	Kristallwasser enthalten
24b		0,04	50 ml MeOH	0,04	20 ml MeOH	120 h	43	analysenrein

analytischen und präparativen Daten von **23a** und **23b** zusammengefasst. Die Synthese des unsubstituierten **23a** erfolgte mit hoher Ausbeute und akzeptabler Reinheit. Die Darstellung des 3-Carboxylderivates **23b** erwies sich indes als ungleich schwieriger. Durch die schlechte Löslichkeit des Eduktes konnte das Diazeniumdiolat nicht ohne Verunreinigung durch das Edukt hergestellt werden. Für die späteren Messungen der Zerfallskinetik war die Verunreinigung allerdings unerheblich.

Piperazinderivate

Im Gegensatz zu Piperidin besitzt Piperazin einen zweiten reaktiven Stickstoff, über den eine Anbindung an weitere molekulare Strukturen möglich ist, und dadurch auch die Synthesen komplexer NONOate durch Umsetzung des ersten Stickstoffs mit NO. In dieser Arbeit wurden die Piperazinderivate **24a** und **24b** hergestellt, deren analytische und präparative Daten Tab. 2 entnommen werden können. Et₂O und CH₃CN (**24a**) bzw. MeOH (**24b**) dienten als Lösungsmittel für die Edukte.

Diazeniumdiolate des Piperazins lassen sich in akzeptablen Ausbeuten und mit hoher Reinheit darstellen. **24a** und **24b** ergänzen eine Reihe komplexerer Piperazinderivate von *Abuo-Rahma*, deren kinetische Untersuchung im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden (siehe Kapitel 2.8.).

Abb. 29 zeigt das ¹H-NMR-Spektrum von **24b** in D₂O (im Vergleich mit dem Edukt). Die der NONOat-Gruppe benachbarten Protonen des Piperazinrings zeigen die für Diazeniumdiolate charakteristische Tieffeldverschiebung.

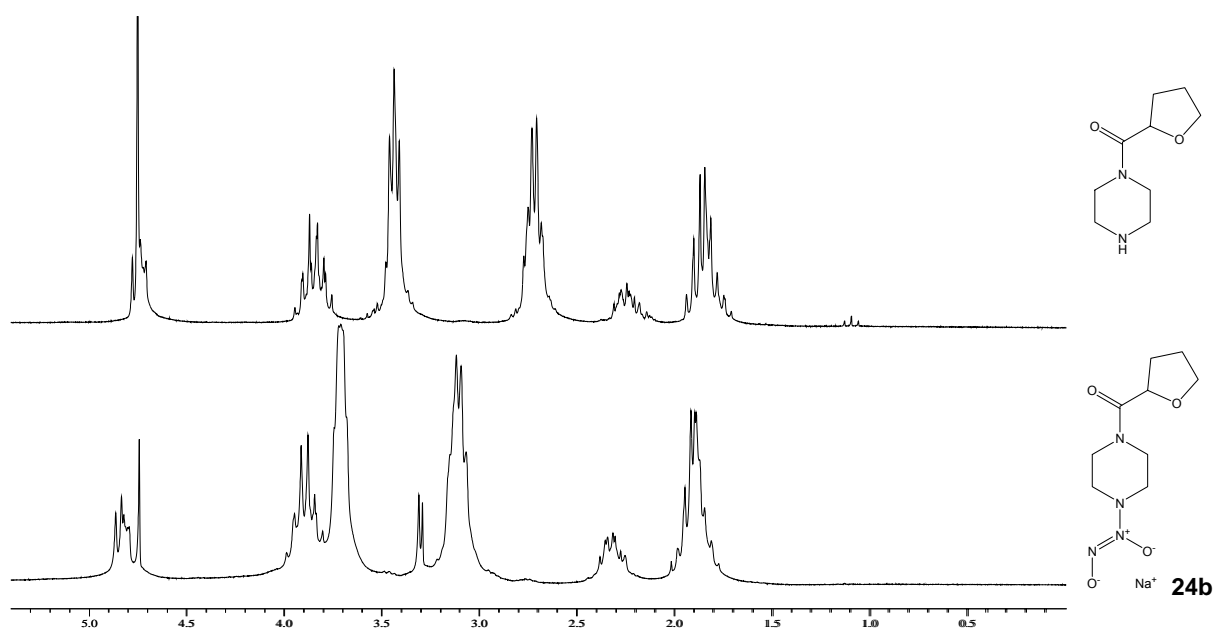


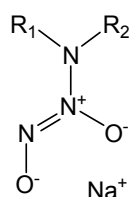
Abb. 29: ¹H-NMR-Spektrum von **24b** und Ausgangsamin in D₂O.

Dialkylaminderivate

Zur Darstellung der Dialkylaminderivate **13a-c** wurden die Edukte in Et₂O und CH₃CN gelöst. Die präparativen Daten können Tab. 3 entnommen werden.

Obwohl die Synthese von DEA/NO (**13a**) in der Literatur ausführlich beschrieben wurde, ist es hier nicht gelungen, Diazeniumdiolate der Dialkylamine analysenrein herzustellen. Die Elementaranalysen von **13a** und **13b** in Tab. 3 weisen stark erniedrigte Werte für Kohlenstoff auf, was auf anorganische Verunreinigungen schließen lässt. Auch der Wechsel des Lösungsmittel (MeOH) und verschiedene Reaktionszeiten brachten nicht die gewünschte Reinheit der Produkte. Die Messungen der kinetischen Zerfallseigenschaften der Substanzen werden allerdings durch anorganische Verunreinigungen nicht gestört. **13c** wurde für die Synthese O²-substituierter NONOate verwendet.

Tab. 3: Präparative Daten der offenkettigen Diazeniumdiolate.



13

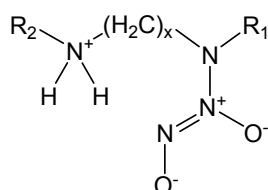
Subst. Nr.	R1	R2	Ansatz (Edukt)	LM (Edukt)	Ansatz (Base)	LM (Base)	t	Ausbeute [%]	Produkt
13a	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	0,2	50 ml Et ₂ O / 50 ml H ₃ CCN	0,2	50 ml MeOH	24 h	7	stark verunreinigt durch anorganische Nitrite und Nitrate
13b	C ₃ H ₇	C ₃ H ₇	0,2	50 ml Et ₂ O / 50 ml H ₃ CCN	0,2	50 ml MeOH	24 h	7	stark verunreinigt durch anorganische Nitrite und Nitrate
13c	CH ₃		0,2	50 ml Et ₂ O / 50 ml H ₃ CCN	0,2	50 ml MeOH	48 h	51	stark verunreinigt durch anorganische Nitrite und Nitrate

Synthese der Diaminderivate

Die Synthese der von Hrabie erstmals beschriebenen zwitterionischen NONOate von Di- und Polyaminen wurde nach Literaturangaben durchgeführt (Hrabie, Klose, Wink, and Keefer, 1993). Im Gegensatz zu den Monoaminen wird auf den Einsatz starker Basen verzichtet. Als Lösungsmittel für die Edukte dienen THF (**17**) und CH₃CN (**22**). Die präparativen Daten können

Tab. 4 entnommen werden. Die Synthese der intramolekularen Salze liefert NONOate in guter Ausbeute und mit hoher Reinheit.

Tab. 4: Präparative Daten der Zwitterionen.



17/22

Subst. Nr.	R1	R2	x	Ansatz	LM	t	Ausbeute [%]	Produkte
17	CH ₃	CH ₃	3	0,078	50 ml THF	24 h	14	analysenrein
22	CH ₃	CH ₃	6	0,034	50 ml CH ₃ CN	24 h	30	analysenrein

1.2.4. Anmerkungen zur Reinheit 1-substituierter Diazeniumdiolate

Die grundsätzliche Problematik der NONOat-Synthese liegt darin, dass es keinerlei Reinigungsmöglichkeiten für das als Feststoff ausfallende Produkt gibt (Umkristallisation der NONOate ist aufgrund der mangelnden Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln nicht möglich). Der Syntheseverlauf und damit die Qualität der anionischen Diazeniumdiolate werden in erster Linie von der molekularen Struktur des Eduktes bestimmt. Grundgerüst sowie sterische und elektronische Einflüsse der Substituenten entscheiden über Darstellbarkeit und Reinheit der NONOate. Erst in zweiter Linie werden diese durch die Herstellungsmethode, Art und Reinheit des Lösungsmittels, Reinheit der Edukte und Reaktionszeit beeinflusst. Der Erhalt analysenreiner NONOate erfordert höchstmögliche Reinheit von Edukten und Lösungsmittel.

1.3. Darstellung O²-vinylierter Diazeniumdiolate

Die O-Alkylierung von Diazeniumdiolaten dient dem Schutz der säurelabilen [N(O)NO]⁻-Gruppe. Die Reaktion, die nach dem in Abb. 30 dargestellten allgemeinen Schema verläuft, beruht auf der Nukleophilie der funktionellen Gruppe gegenüber einer Vielzahl von Elektrophilen wie Alkylhalogeniden, Alkylsulfaten oder Epoxiden. Um die Stabilität der Diazeniumdiolat-Salze während der Reaktion zu gewährleisten, muss unter basischen Bedingungen gearbeitet werden.

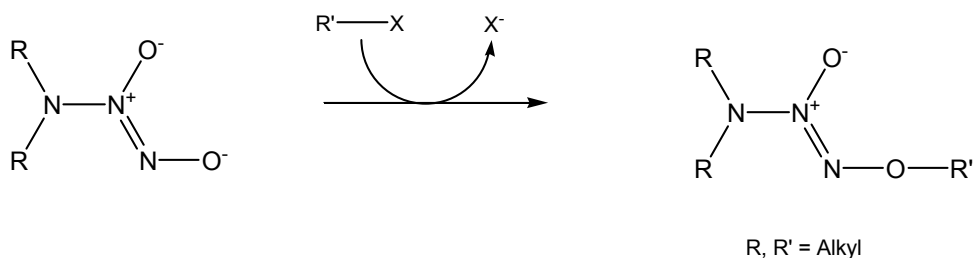


Abb. 30: O²-Alkylierung der Diazeniumdiolat-Gruppe.

Darüber hinaus ist es möglich, die O²-Substituenten synthetisch zu verändern, ohne die Diazeniumdiolat-Gruppe zu zerstören. So gelang *Saavedra* durch die Elimination einer halogenhaltigen O²-Seitenkette die Darstellung des *prodrugs* V-PYRRO (**15**) (Hrabie and Keefer, 2002). Die durch Cytochrom-P-450 spaltbare Vinylgruppe hat eine besondere Bedeutung: sie ermöglicht neben der freien Zirkulation des NONOates in der Blutbahn die gezielte Applikation von NO an den Leberzellen.

Die Synthese der O²-vinylierten Diazeniumdiolate erfolgte aus Natriumsalzen der Diazeniumdiolat-Ionen **13a** und **16a**, die in THF unter Eiskühlung und in Gegenwart von wasserfreiem Natriumcarbonat jeweils mit 1,2-Dibromethan versetzt wurden. Nach 72 Stunden Rühren bei Zimmertemperatur wurde das festgewordene Reaktionsgemisch wieder auf 0°C gekühlt und mit destilliertem Wasser versetzt. Das Bromethyl-Derivat wurde extrahiert und in THF mit NaOH und H₂O 24 Stunden refluxiert. Nach Extraktion wurde die organische Phase eingeeengt und der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt. Abb. 31 zeigt exemplarisch die Synthese von **25**.

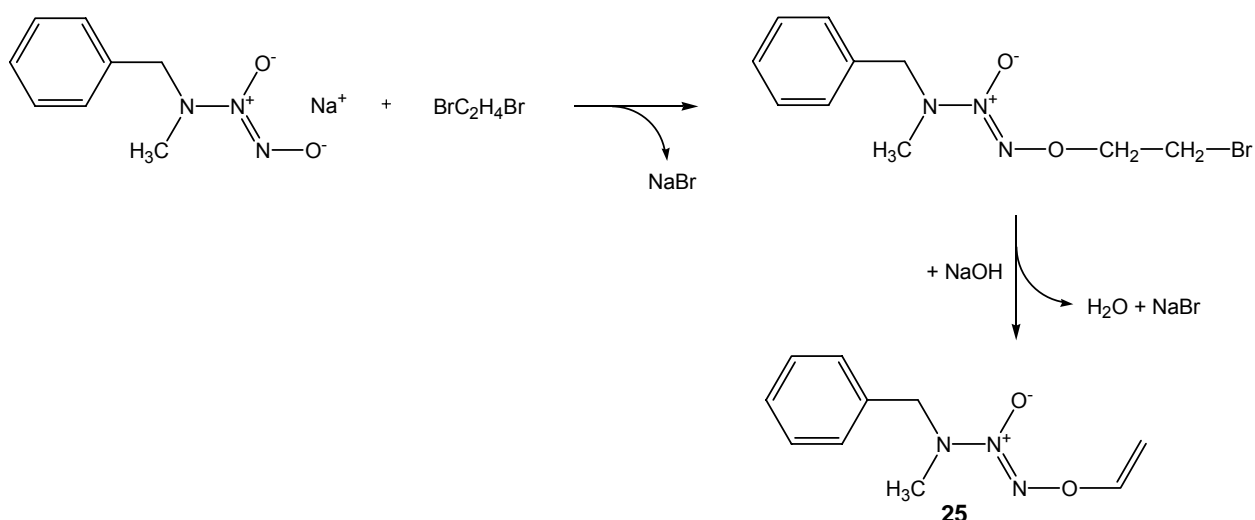


Abb. 31: Synthese von **25**.

In Abb. 32 sind die chemischen Verschiebungen von **15** und **25** dargestellt. Zum Vergleich ist das literaturbekannte **25** abgebildet. Durch den Phenylring in **25** liegen die Protonensignale der Vinylgruppe weiter im Tieffeld als in den Spektren der Vergleichssubstanzen **15** und **26**.

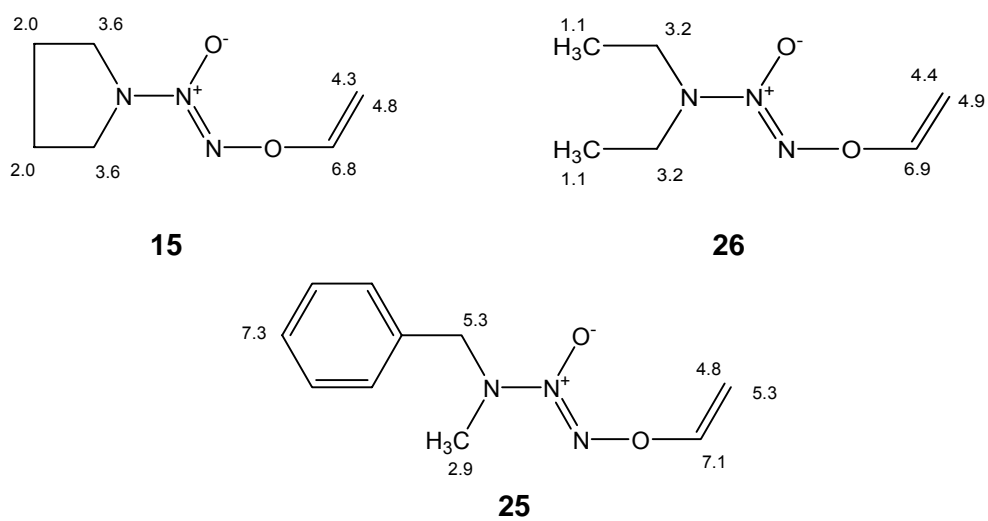


Abb. 32: Chemische Verschiebungen von **15**, **25** und **26** im ^1H -NMR.

2. Analytik der Diazeniumdiolate - Untersuchungen der Freisetzung von Stickstoffmonoxid aus Diazeniumdiolaten durch Laser Magnet Resonanz Spektroskopie

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Bestimmung von NO-Freisetzungsprofilen der synthetisierten Diazeniumdiolate. Auf deren Basis sollten allgemeine Struktur-Freisetzungsbeziehungen aufgezeigt und deren Abhängigkeit von pH und Temperatur untersucht werden.

Im Rahmen einer Kooperation mit dem Lehrstuhl für angewandte Physik konnte erstmals die Technologie der Laser Magnet Resonanz Spektroskopie (LMRS) zur Durchführung der dafür notwendigen Liberationsversuche angewendet werden. Zuvor wurde dieses hoch empfindliche chemo- und isotopomerelektive Spektroskopieverfahren unter anderem zum Nachweis von Stickstoffmonoxid in der ausgeatmeten Luft verwendet (Mürtz et al., 1999).

Im Folgenden wird über die Übertragung dieser Nachweismethode auf die Freisetzungsanalytik von Diazeniumdiolaten berichtet. Dabei werden neben den Grundlagen der LMRS Aufbau, Durchführung und Auswertung der Liberationsversuche sowie deren Ergebnisse ausführlich beschrieben. Zunächst ein Überblick über literaturbekannte Methoden zum Nachweis von NO.

2.1. Literaturbekannte Verfahren zum Nachweis von Stickstoffmonoxid

In der Literatur sind verschiedene spektroskopische und elektrochemische Methoden zum Nachweis von Stickstoffmonoxid beschrieben (siehe *Tab. 5*). Die Wahl des geeigneten Verfahrens richtet sich nach den Anforderungen, die durch das Experiment an die Apparatur gestellt werden. So ist beispielsweise zu berücksichtigen, wie empfindlich die Messung sein muss, wo und in welchem Maßstab sie durchgeführt werden soll (ex vivo oder in vivo; im Gasraum oder im wässrigen Milieu), welche Messungen parallel durchgeführt werden sollen (NO_2^- , NO_3^- , S-Nitrosothiole), welche am Experiment beteiligten Stoffe den Nachweis empfindlich stören können. Nicht zuletzt müssen Kosten und Anforderungen in einem vertretbaren Verhältnis stehen. *Tab. 5* informiert über die wichtigsten Eigenschaften der literaturbekannten Methoden und stellt sie den jeweiligen Kosten gegenüber. Nachfolgend werden die verschiedenen Messprinzipien kurz erläutert.

2.1.1. Colorimetrische Methoden

Bei den bekannten colorimetrischen Verfahren handelt es sich in der Regel um empfindliche (1 μM), indirekte Nachweismethoden für NO in wässrigen Medien.

Tab. 5: Nachweisverfahren für NO im Vergleich.

Gerät Typ	UV/VIS mit Farbreaktion <i>Colorimetric Assay Kit</i>	NO-Elektroden <i>amiNO-Elektrode, ISO-NOP-Sensor</i>	Chemilumineszenz- Spektrometer <i>Nitric Oxide Analyzer, CLD 822 S hr</i>	EPR-Spektrometer <i>EPR 300 E</i>	FLMR-Spektrometer
Hersteller	Cayman Chemicals	Harvard Apparatus, World Precision Instruments	Sievers, Eco-Physics	Bruker	IN VIVO
Prinzip	Griess-Reaktion, UV/VIS Spektroskopie	Diffusion durch NO- selektive Membran, Amperometrie	Ozon-Chemilumineszenz Spektroskopie	Elektronen Spin Resonanz Spektroskopie (ESR)	Faraday Laser Magnet Resonanz Spektroskopie (FLMR)
Detektion	NO _{aq}	NO _{aq}	NO _{gas}	NO-Spintrap-Komplex _{aq}	NO _{gas}
NO-Nachweis	indirekt	direkt	indirekt	indirekt	direkt
Preis (€)	150,- (192 Versuche)	9000 - 17000,-	25000 - 45000,-	>50000,-	>50000,-
Nachweisgrenze	1 µM	0.3-1 nM	1 nM	1 nM	<1 nM
NO-Selektivität	nein	nein	ja	ja	ja
Echtzeitanalyse	nein	verzögert	leicht verzögert	ja	ja
Parallelmessungen	NO ₂ , NO ₃	NO ₂ , NO ₃	NO ₂ , NO ₃ , S-Nitrosothiole	nein	NO ₂ , NO ₃ , S-Nitrosothiole
in vivo	nein	ja	nein	ja	nein
¹⁵ NO	nein	nein	nein	k.A.	ja
Lit.	Moncada (1992)	Pfeiffer (1998)	Marley and Feelisch (2000)	Nedeianu (2002)	Horstmann (2002)

Sie basieren auf Farbreaktionen, deren Produkte anschließend mit Hilfe der UV/VIS-Spektroskopie quantifiziert werden können. Echtzeitanalysen sind häufig nicht möglich, die Anwesenheit von Nitrit und Nitrat stört zumeist den Nachweis.

Da in den meisten Laboratorien UV/VIS-Spektrometer zur Verfügung stehen, können colorimetrische Assays kostengünstig und mit geringem Aufwand durchgeführt werden („*Poor man's methods in NO research*“).

Das bekannteste colorimetrische Verfahren beruht auf der Griess-Reaktion. Ihr liegt die Bildung des in Abb. 33 dargestellten Azofarbstoffes zu Grunde. Zum colorimetrischen Nachweis von NO

mittels Griess-Reaktion werden von der Firma Cayman Chemicals® präparierte Mikrotiterplatten angeboten (Tab. 5).

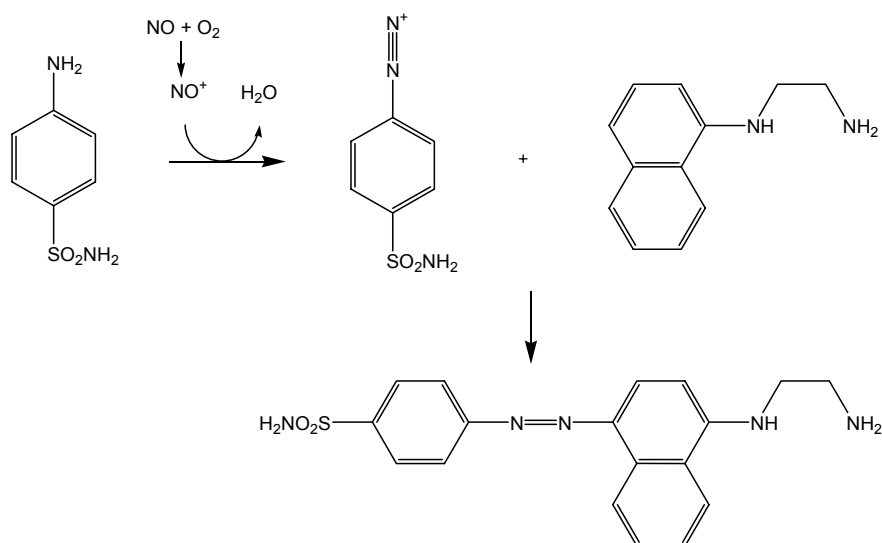


Abb. 33: Griess-Reaktion: Diazotierung von Sulfanilamid durch NO^+ und anschließende Azokupplung mit N-(1-Naphthyl)ethylenediamin (NEDD) zum Azofarbstoff (λ_{max} : 540 nm).

2.1.2. NO-Elektroden

NO-Elektroden (Harvard Apparatus® und World Precision Instruments®) sind hoch empfindliche Sensoren zum direkten Nachweis von NO in wässrigen Lösungen. Die Detektion erfolgt amperometrisch. Freigesetztes NO diffundiert durch eine NO-selektive Membran und wird an der Oberfläche der Arbeitselektrode oxidiert, wobei der erzeugte Redoxstrom aufgezeichnet wird (Abb. 34).

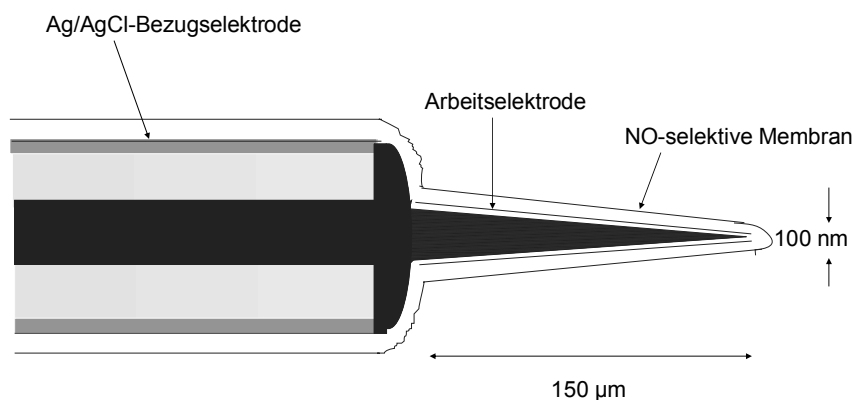


Abb. 34: Abbildung eines NO-Sensors der Firma World Precision Instruments®. Die Arbeitselektrode besteht aus Graphit, die Bezugselektrode arbeitet mit Ag/Ag^+ .

Bei einem Arbeitspotential von 0.9 V ist die gemessene Stromstärke der NO Konzentration in der Probe proportional. NO-Sensoren sind Kombinationselektroden, bei denen die NO-detektierende Arbeitselektrode und die Referenzelektrode in der gleichen elektrisch abgeschirmten Sonde Platz finden. Somit kann das System auch bei sehr geringen Probenvolumina angewendet werden. Das Problem vieler NO-Sensoren ist die mangelnde Selektivität. Bei einem Arbeitspotential von 0.9 V werden neben NO auch Ascorbinsäure, Catecholamine, Nitrat und Nitrit oxidiert (siehe Abb. 35), deren Anwesenheit folglich die Messung stört.

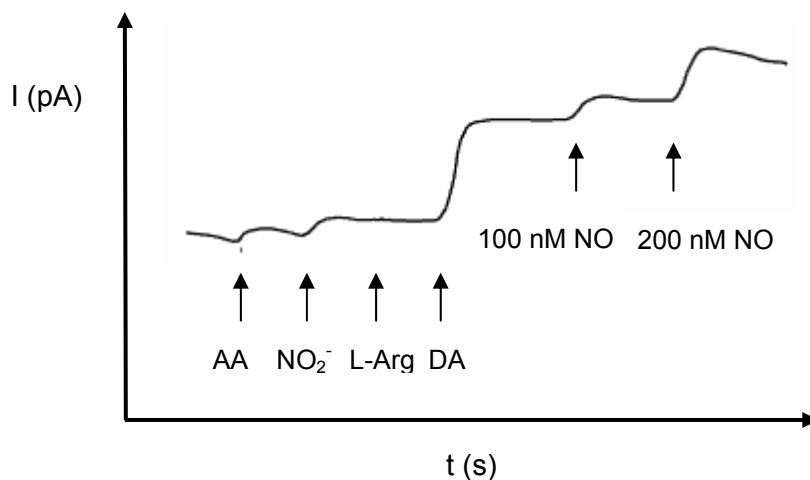


Abb. 35: Die Reaktion eines einfachen NO Sensors (0.9 V) auf Zugabe von 50 μM Ascorbinsäure (AA), 50 μM Nitrit, 100 μM L-Arginin (L-Arg), 2 μM Dopamin (DA), 100 nM und 200 nM NO.

Um der Störwirkung solcher Stoffe entgegenzutreten, wurden zahlreiche Verbesserungen an den Sensoren vorgenommen. Ein wichtiger Schritt war dabei die Optimierung der Elektrodenoberfläche, mit deren Hilfe die Selektierung durchtretender Teilchen nach Größe und Ladung möglich ist.

2.1.3. Chemilumineszenz Spektroskopie

Die Chemilumineszenz-Detektion (CLD) zählt zu den am häufigsten zitierten Nachweisverfahren für NO in der Literatur (siehe Tab. 5). Es ist ein indirektes, extrem empfindliches analytisches Verfahren für Stickstoffmonoxid in der Gasphase und zeichnet sich durch eine hohe Selektivität aus. Chemilumineszenz beruht auf der Emission von Lichtquanten, die durch eine chemische Reaktion erzeugt werden. Bei der Umsetzung mit Ozon reagiert NO zu elektronisch angeregtem Stickstoffdioxid. NO_2^* geht unter Emission von elektromagnetischer Strahlung anschließend wieder in den Grundzustand über. Die Lumineszenz wird photoelektrisch detektiert und aufgezeichnet. Wird ein großer O_3 -Überschuss eingesetzt, ist die

Intensität der elektromagnetischen Strahlung proportional zum NO-Stoffmengenanteil im Probengas.

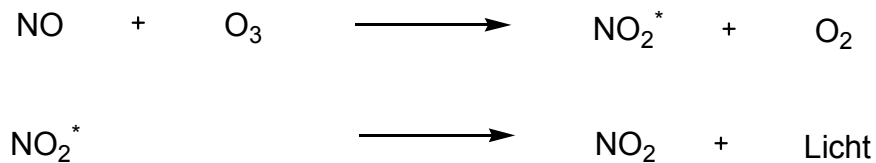


Abb. 36: Reaktion von NO mit Ozon zu angeregtem Stickstoffdioxid (NO_2^*). Die beim Übergang in den Grundzustand emittierte elektromagnetische Strahlung wird photoelektrisch registriert und ist der NO-Menge proportional.

Mit dem Ozon-CLD-Verfahren arbeiten viele kommerzielle NO-Detektoren, so auch der *Nitric Oxide Analyzer* des Marktführer SIEVERS® und der *CLD 822 S hr* von *Eco Physics*® (Tab. 5). Ozon-CLD-Spektrometer sind deutlich teurer als NO-Sensoren. Sie eignen sich hervorragend zur NO-Detektion im Gasraum.

2.1.4. Elektronenspin Resonanz Spektroskopie

Ein wichtiges Verfahren zur NO-Analyse stellt die Elektronenspin Resonanz Spektroskopie (abgekürzt ESR oder EPR) dar. Neben einigen NO-Sensoren ist die ESR das einzige Verfahren, mit dem man NO in vivo nachweisen kann (siehe Tab. 5). Es ist eine indirekte, selektive und hoch empfindliche Methode zum Nachweis von NO in wässrigen Medien. Bei der Elektronenspin Resonanz Spektroskopie werden wie bei der LMRS paramagnetische Moleküle bestimmt, indem die ungepaarten Elektronen durch ein von außen angelegtes Magnetfeld mit elektromagnetischer Strahlung in Resonanz gebracht werden. Im Gegensatz zur infrarotspektroskopischen LMR-Analytik liegt die bei der ESR verwendete Strahlung im Mikrowellenbereich (10 GHz).

Durch das Magnetfeld werden die unpaarigen Elektronen in zwei unterschiedliche, ihrem gegensätzlichen Spin entsprechende Energieniveaus ($-1/2/+1/2$) aufgespaltet. Die Resonanzbedingung ist erfüllt, wenn eine elektromagnetische Welle mit der Frequenz (ν), die der Differenz dieser Energiezustände entspricht, eingestrahlt wird (Abb. 37). Das in Abb. 38 dargestellte ESR-Spektrum erhält man, indem man die Mikrowellen-Absorption bei einer Änderung der Feldstärke registriert. Die Lage des Signals gibt Aufschluss über die Art des Radikals, die Intensität des Signals ist proportional zur Konzentration.

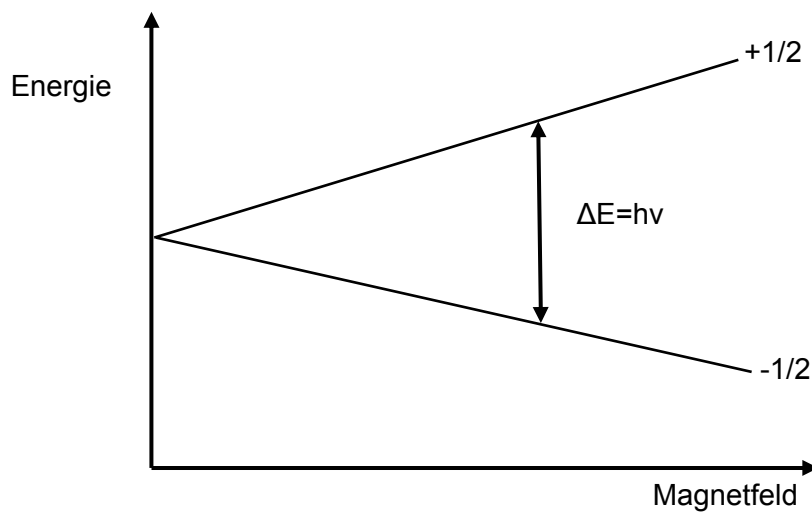


Abb. 37: Zeeman-Effekt. Aufspaltung der ungepaarten Elektronen in zwei Energieniveaus ($+1/2$ und $-1/2$). Ist die Differenz (ΔE) zwischen den Niveaus gleich der Energie der eingestrahlten elektromagnetischen Welle ($h\nu$), ist die Resonanzbedingung erfüllt.

Das NO-Signal im ESR-Spektrum ist breit und schlecht zu detektieren. Daher kommen bei der ESR-Detektion von Stickstoffmonoxid so genannte Spintrap-Moleküle zum Einsatz, diamagnetische Stoffe, die mit NO stabile radikalische Komplexe bilden (Spin-Trapping-Technik). Bei der Detektion von NO bieten sich eisenhaltige Komplexbildner wie Hämoglobin, Eisen-Diethyldithiocarbamat ($\text{Fe}(\text{DETC})_2$) und N-Methyl-D-glucamindithiocarbamat ($\text{Fe}(\text{MGD})_2$) an. Abb. 38 zeigt das ESR-Signal eines NO- $\text{Fe}(\text{DETC})_2$ -Komplexes, dessen Höhe der NO-Konzentration proportional ist.

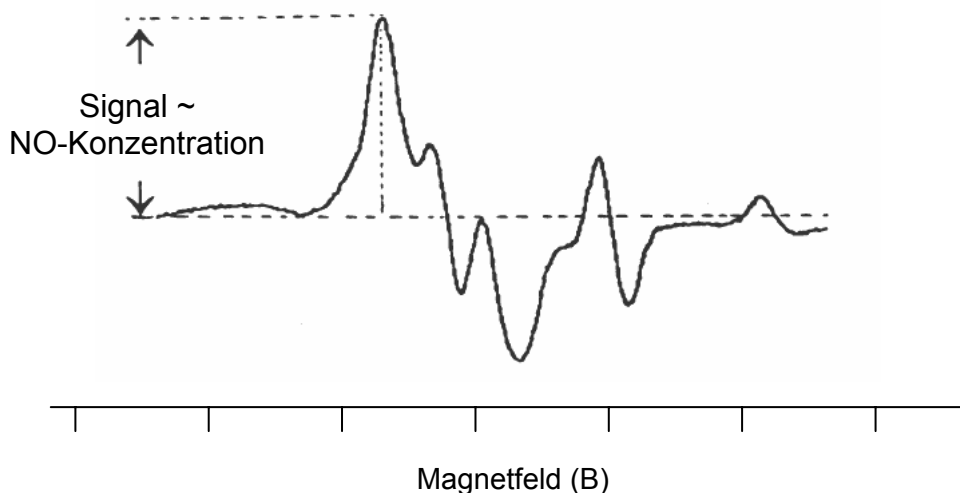


Abb. 38: ESR-Signal eines NO- $\text{Fe}(\text{DETC})_2$ -Komplexes. Die Signalthöhe ist proportional zur NO-Konzentration.

Weitere Nachweisverfahren für Stickstoffmonoxid, auf die an dieser Stelle nicht eingegangen werden soll, sind Massenspektrometrie und Chemilumineszenzverfahren mit Luminol.

2.2. Grundlagen der Laser Magnet Resonanz Spektroskopie

Die Laser Magnet Resonanz Spektroskopie (LMRS) ist eine der empfindlichsten Spektroskopieverfahren im fernen und mittleren infraroten Wellenlängenbereich (Urban and Schmidt, 2000). Sie wurde von Evenson 1968 entwickelt und dient dem Nachweis paramagnetischer Substanzen in der Gasphase (Evenson, 1968). Diese haben durch ein ungepaartes Elektron ein magnetisches Moment und können deshalb mit einem von außen angelegten Magnetfeld in Wechselwirkung treten. Der Spin dieses Elektrons wird nicht vom gegensätzlich ausgerichteten Spin eines anderen Elektrons kompensiert und kommt deshalb makroskopisch zur Geltung (Knowles et al., 1976).

Im Magnetfeld nehmen ungepaarte Elektronen zwei unterschiedliche Energiezustände mit gegensätzlich ausgerichtetem Spin ein (Zeeman-Effekt). Wie Abb. 39a zeigt, richten sich die Elektronen entweder parallel zum Magnetfeld aus ($-1/2$), wozu nur ein geringerer Energieaufwand notwendig ist, oder sie orientieren sich mit einem höheren Energiezustand in entgegengesetzter Richtung ($+1/2$).

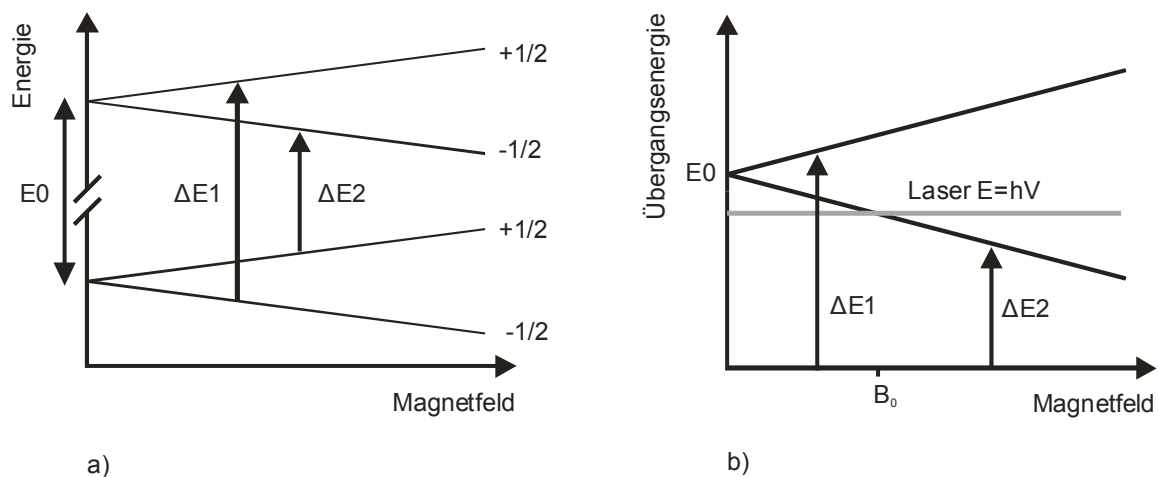


Abb. 39: Aufspaltung der Energiezustände der ungepaarten Elektronen eines Radikals im Magnetfeld. Erläuterung siehe Text.

Zusätzlich können Elektronen unter Energieaufnahme (ΔE) in höhere Energieniveaus wechseln (Abb. 39a). Gemäß der Auswahlregeln sind hier nur Übergänge von $+1/2$ zu $-1/2$ bzw. $-1/2$ zu $+1/2$ erlaubt. Mit Erhöhung der Magnetfeldstärke und der daraus resultierenden Aufspaltung wird der Abstand zwischen den Niveaus zunehmend größer (ΔE_1) bzw. kleiner (ΔE_2). In Abb. 39b ist ΔE gegen die Feldstärke des Magneten aufgetragen. Nur ΔE_2 schneidet die als Parallele zur X-Achse eingezeichnete Laserlinie mit $E = h \cdot \nu$. Für diesen Schnittpunkt ist die Resonanzbedingung erfüllt. Das angelegte Magnetfeld B_0 verändert die Übergangsfrequenz der Moleküle derart, dass sie gleich der eingestrahlichten Laserfrequenz ist.

Kommt es bei B_0 zur Resonanz von Molekülübergang und Laserfrequenz, so tritt Absorption auf, die der NO-Konzentration proportional ist. Die Nachweisempfindlichkeit des Spektrometers lässt sich allerdings erheblich steigern, wenn man sich die mit der Absorption einhergehende Dispersion zu Nutze macht. Wenn Resonanz vorliegt, findet eine Polarisationsdrehung des Laserlichts statt, die mit einem Analysator in eine Intensitätsänderung umgesetzt wird (Hinz, 1982). Beim polarisationsempfindlichen Nachweis (Faraday-LMR) befindet sich deshalb die Spektroskopiezelle zwischen zwei fast gekreuzten Polarisatoren (Abb. 40).

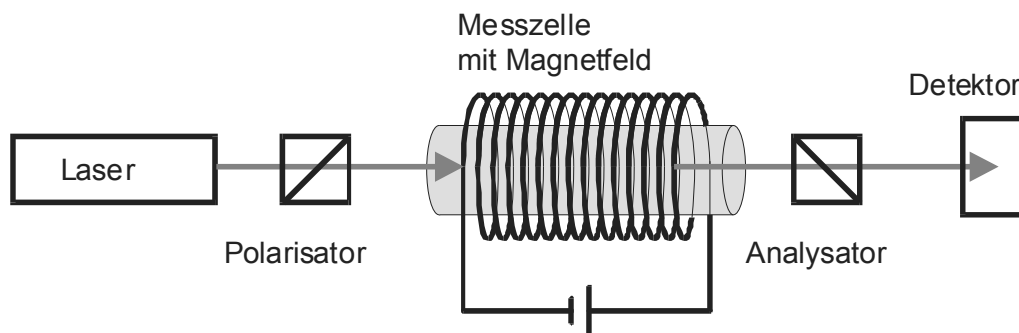


Abb. 40: Schematische Darstellung eines FLMR-Detektors.

Der erste Polarisator erhöht die Polarisationsgüte des Laserlichts, der zweite Polarisator weist als Analysator die Polarisationsdrehung nach. Liegt keine Resonanz vor, so gelangt fast keine Laserintensität auf den Detektor. Nur wenn im Resonanzfall die Polarisationsrichtung des Laserlichtes leicht gedreht wird, fällt Laserleistung auf den Detektor. Damit handelt es sich bei der Faraday-LMR um eine nahezu untergrundfreie und damit hoch empfindliche Untersuchungsmethode (Urban and Schmidt, 2000).

Um das Rauschen des Signals weiter zu reduzieren, wird dem Magnetfeld B zusätzlich ein kleineres Magnetfeld B_{mod} aufgeprägt (Menzel, 1997). Durch dieses Wechselfeld wird die Frequenz im Bereich des Dispersionssignals periodisch geringfügig erhöht und erniedrigt. Dieser Effekt, den man sich wie ein Abtasten des Signals vorstellen kann, wird Modulation genannt. Mit Hilfe eines Lock-In-Verstärkers erhält man das in Abb. 41 dargestellte Signal. Die Höhe des Signals ist der NO-Konzentration proportional.

Die Eigenschaften der Faraday Laser Magnet Resonanz Spektroskopie (FLMRS) werden in Tab. 5 im Vergleich mit weiteren Verfahren zur NO-Analytik gezeigt. Sie sind

- Direkte Messung von NO im Gasraum
- Niedrige Nachweisgrenze (< 1 ppb bzw. 1 nM)
- Isotopenselektivität ($^{14}\text{N}^{16}\text{O}$ und $^{15}\text{N}^{16}\text{O}$)
- Echtzeitanalyse ohne Querempfindlichkeiten zu anderen Gasen.

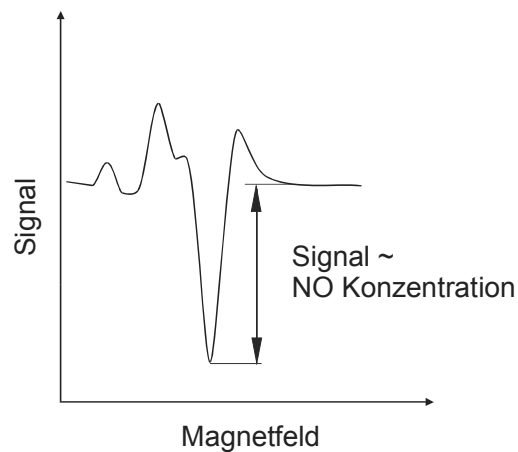


Abb. 41: LMR- Dispersionssignal von NO aus (Menzel, 2000).

2.3. Versuchsaufbau

Die Freisetzungsapparatur für NONOate wird in Abb. 42 schematisch dargestellt. Sie besteht aus einer Freisetzungszelle und der LMR-Detektionseinheit.

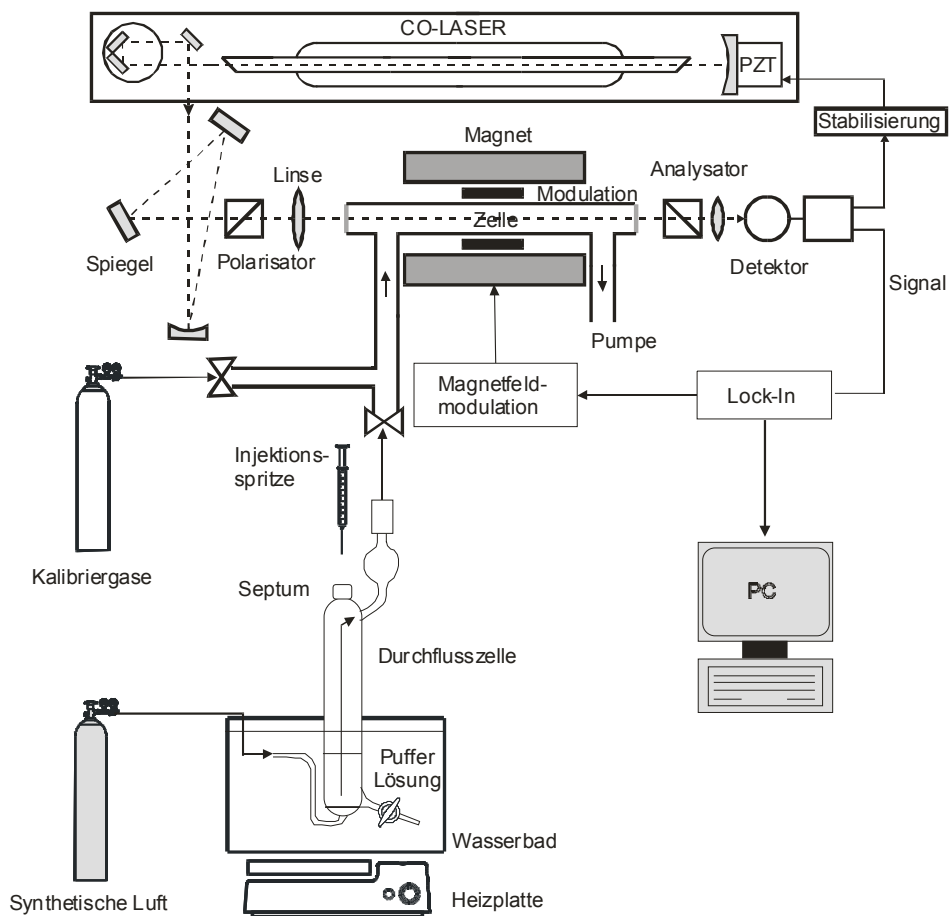


Abb. 42: Aufbau des Faraday-LMR-Spektrometers mit Zubehör zur Freisetzungsanalyse synthetischer NO-Donoren (hier mit Durchflusszelle).

2.3.1. Liberationszellen

Als Liberationszelle diente anfangs ein einfacher Dreihalskolben, später eine im Rahmen dieser Arbeit entworfene und optimierte Durchflussszelle (*purge vessel*).

Der Dreihalskolben ist ausgerüstet mit einer Rührvorrichtung, einem Septum für die Probenzugabe und mit zwei Glasrohren für Ein- und Auslass des Trägergases, welches für den Transport des NO zur Detektionszelle benötigt wird. Vorteilhafter ist allerdings die Verwendung der Durchflussszelle, die in Abb. 43 dargestellt ist.

Über ein Glasrohr gelangt das Trägergas in die Zelle, passiert eine Glasfritte und perlt durch die Pufferlösung. Über ein Septum kann die Probenlösung in den Puffer injiziert werden. Freigesetztes Stickstoffmonoxid wird vom Trägergas erfasst und in das LMR-System transportiert. Der Gasstrom, der durch ein der Durchflussszelle vorgeschaltetes Nadelventil exakt einstellbar ist, durchmischt gleichmäßig die Pufferlösung und macht den Einsatz weiterer Rührwerkzeuge überflüssig. Ein Überlauf mit Tropfenfänger verhindert das Eindringen von Wasser in die Spektroskopiezelle der Detektionseinheit. Der Abflusshahn ermöglicht einen schnellen Austausch der Pufferlösung und erleichtert die Reinigung der Zelle.

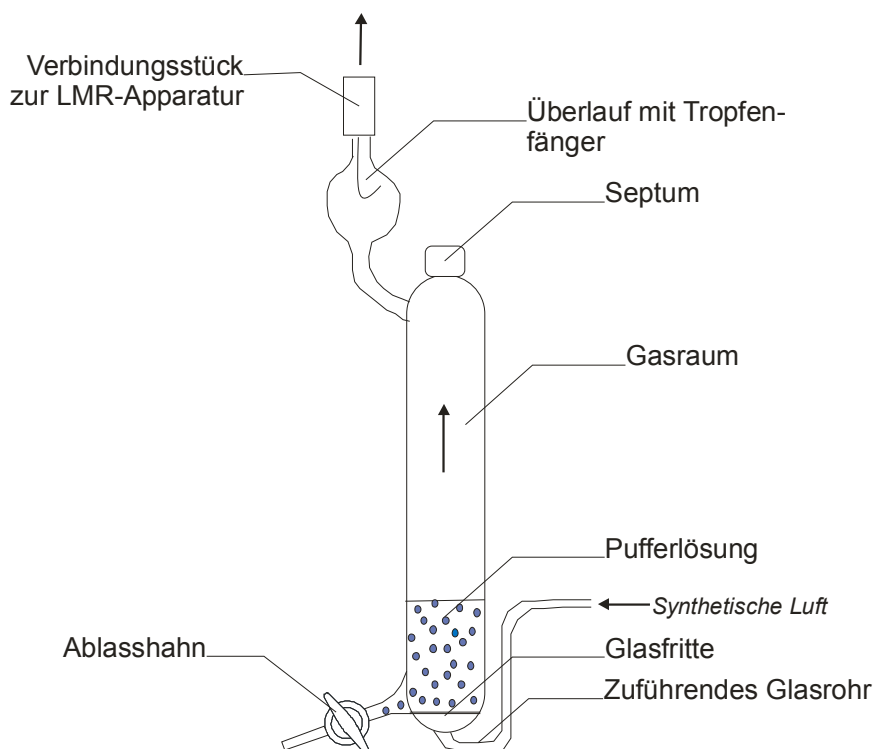


Abb. 43: Durchflussszelle mit Septum und Glasfritte zur Freisetzung von NO aus Diazoniumdiolen. Über das Septum wird die Probenlösung zugeführt. Das Transportgas wird durch die Pufferlösung geleitet und macht so den Einsatz eines Rührers überflüssig.

2.3.2. LMR-Detektionseinheit

Als Strahlungsquelle für den in *Abb. 42* abgebildeten LMR-Detektor dient ein Kohlenmonoxid-Laser, der mit flüssigem Stickstoff gekühlt wird. Über ein Reflexionsgitter wird die Laserstrahlung (gestrichelte Linie) ausgekoppelt und gelangt über mehrere Spiegel zu einem Polarisator, der zur Nachpolarisation des Laserlichts verwendet wird. Über ein Fenster tritt der Strahl in die Spektroskopiezelle ein. Die Zelle befindet sich innerhalb eines mit flüssigem Helium gekühlten Spulenmagneten. Mit einer wassergekühlten Kupferspule wird zusätzlich zum Hauptmagnetfeld ein kleineres Magnetfeld, welches der Effektmodulation dient, erzeugt. Der aus der Zelle austretende Strahl fällt durch einen weiteren Polarisator, der als Analysator nahezu gekreuzt zum Polarisator steht. Lediglich der in seinem Polarisationszustand veränderte Teil des Laserlichts wird auf einem Halbleiterdetektor fokussiert und registriert. Der Detektor ist mit einem Lock-In-Verstärker verbunden, der auf der Frequenz der Magnetfeldmodulation arbeitet. So kann die Signalamplitude über den Lock-In-Verstärker zu einem Rechner übertragen und dort aufgezeichnet werden. Die zeitaufgelöste Veränderung des Signals und damit die NO-Konzentration kann *online* auf einem Monitor verfolgt werden (*Echtzeitanalyse*). Ein konstanter Volumenstrom synthetischer Luft erfasst das freigesetzte NO und transportiert es zur Spektroskopiezelle. Der Gasstrom wird durch eine Pumpe am Ende des Systems erzeugt und kann über Ventile genau eingestellt werden.

2.4. Kalibrierung und Bestimmung der Nachweisempfindlichkeit

Das Gassystem am Einlass der Spektroskopiezelle in *Abb. 42* ist so ausgelegt, dass wahlweise eine Probenmessung oder eine Kalibrierung mit Hilfe eines Prüfgases durchgeführt werden kann. Um eine hohe Messgenauigkeit zu erreichen, sollte das Spektrometer vor und nach jedem Versuchstag kalibriert werden (Menzel, 2000). Die Kalibrierung erfolgt durch die Einstellung verschiedener Partialdrücke NO-freier synthetischer Luft (80% N₂, 20% O₂) und eines stabilen NO-Prüfgases.

Abb. 44 zeigt das LMR-Signal eines Prüfgases mit einer NO-Konzentration von 1 ppm. Weitere Prüfgaskonzentrationen werden aufgenommen und die gemittelten LMR-Signalhöhen gegen die NO-Konzentration aufgetragen. Man erhält eine über den ppb-Bereich gültige Kalibriergerade (*Abb. 45*).

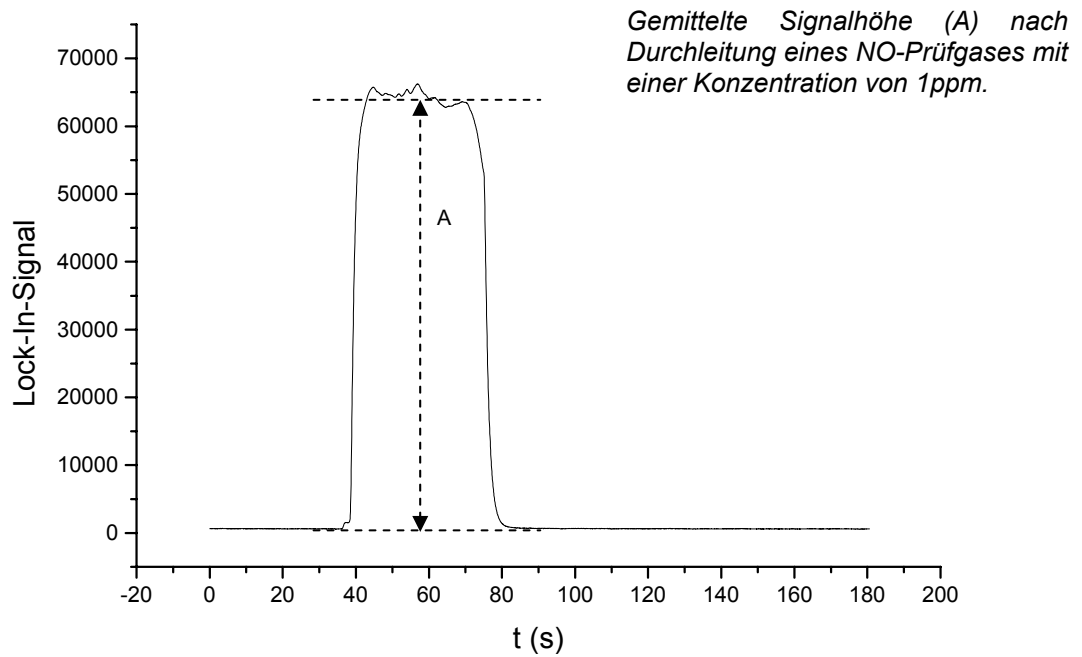


Abb. 44: Die Kalibrierung des LMR-Detektors erfolgt durch die Messung verschiedener NO-Prüfgaskonzentrationen (hier 1 ppm). Die jeweiligen Signalhöhen (A) werden gegen die Konzentrationen dieser Prüfgase aufgetragen und ergeben eine Kalibriergeraden (Abb. 45).

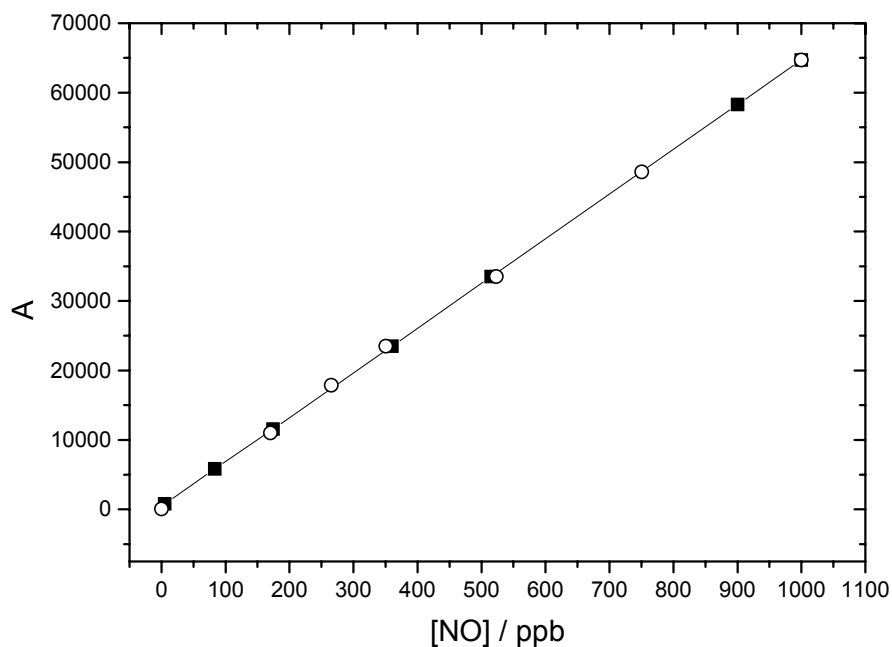


Abb. 45: Beispiel einer NO-Kalibriergeraden aufgenommen vor (schwarz) und nach (weiß) einem Versuchstag. Mit Hilfe der Kalibriergeraden können die Lock-In-Signale der LMR-Detektionseinheit in ppb umgerechnet werden.

Neben der Kalibrierung der Messapparatur ist die Bestimmung der Nachweisgrenze von Wichtigkeit. Dies gilt vor allem für die Beurteilung der Messwerte von Proben mit sehr geringen Konzentrationen.

Als Nachweisgrenze wird die Höhe des kleinsten detektierbaren Signals definiert. Sie wird über das Verhältnis von Signal und Rauschen bestimmt (Gäbler, 2002). Das Signal-Rauschen-Verhältnis ist der Quotient aus Höhe des Prüfassignals (A) und Standardabweichung (s) des Basislinienrauschens (Rücker et al., 1988).

Die Bestimmung der Nachweisgrenze ist in Abb. 46 anhand eines Beispiels erläutert.

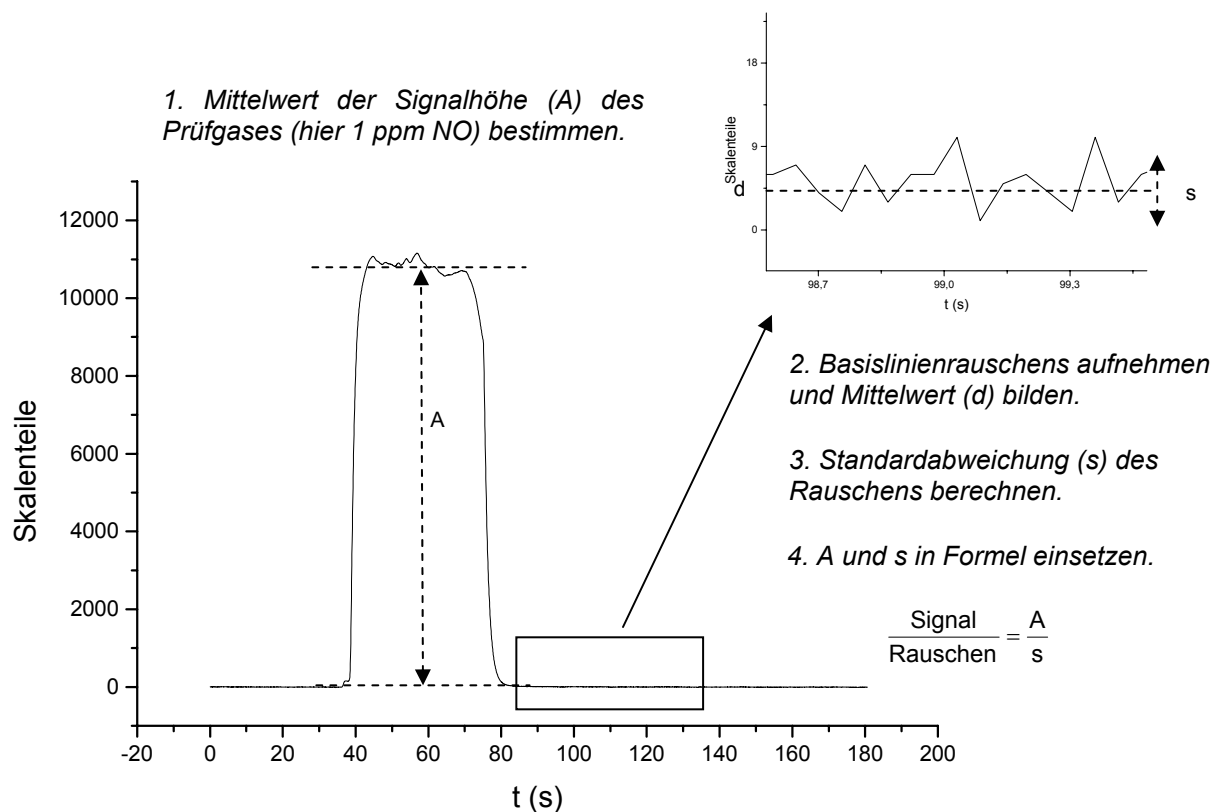


Abb. 46: Bestimmung der Nachweisgrenze durch Berechnung des Signal-Rauschen-Verhältnisses.

2.5. Durchführung der Freisetzungsversuche

Den NO-Freisetzungsversuchen dieser Arbeit liegen - wie zu Beginn dieses Kapitels beschrieben - unterschiedliche Fragestellungen zu Grunde. Allen Versuchen gemein ist die Durchführung in der zuvor beschriebenen zweiteiligen Versuchsanordnung: die NO-Liberation aus wässrigem Medium erfolgt in der Freisetzungszelle, NO wird im Gasraum durch die LMR-Detektionseinheit erfasst und aufgezeichnet.

Daher gehen wir an dieser Stelle zunächst auf die allgemeine Durchführung und Auswertung der Freisetzungsversuche ein. Detailliertere Versuchsbeschreibungen können den nachfolgenden Kapiteln entnommen werden.

Vorbereitung der Messung

Zunächst werden 0.01 M Stammlösungen der zu vermessenden Diazeniumdiolate hergestellt. Da Diazeniumdiolate nur in basischen Lösungen stabil sind, wird dazu eine wässrige 0.01 M Natronlauge verwendet. Die Stammlösungen sollten möglichst zu Beginn des Versuchstages frisch hergestellt und anschließend lichtgeschützt im Kühlschrank aufbewahrt werden.

Die Freisetzungsmedien werden ausgewählt und vor Beginn des Versuches auf dem Wasserbad auf die gewünschte Temperatur gebracht. In der Regel reicht ein Volumen von 10-30 ml für einen Freisetzungsversuch aus.

Kurz vor Beginn eines Versuchs wird die Probenlösung des NONOates hergestellt. Dazu werden 200.0 µl der Stammlösung in ein Glasgefäß mit 3.0 ml 0.01 M NaOH pipettiert.

Wahl der Freisetzungszelle

Für die Freisetzungsversuche standen zwei verschiedene Freisetzungszellen zur Verfügung. Bei der NO-Freisetzung im Dreihalskolben (mit Magnetrührer) wird das Trägergas nicht durch die Pufferlösung hindurch sondern lediglich über die Oberfläche hinweg geleitet. Freigesetztes NO muss folglich zunächst durch die Pufferlösung zur Phasengrenze diffundieren, bevor es in den Gasraum gelangt. Vom Volumenstrom erfasst wird es dann zur Detektionszelle transportiert.

Aus diesem Grund entspricht die in der LMR-Zelle pro Zeiteinheit gemessene NO-Konzentration nicht der *tatsächlichen* Freisetzungsgeschwindigkeit des NONOates in der Pufferlösung. Vielmehr wird die *gemessene* Liberationsgeschwindigkeit von der Diffusionszeit des freigesetzten NO beeinflusst. Je größer das gewählte Puffervolumen ist (d.h. je größer der Weg zur Phasengrenze ist), desto niedriger ist die *gemessene* Freisetzungsgeschwindigkeit. Eine höhere Verweildauer in der Lösung führt zudem zu einem hohen Verlust durch Abreagieren des kurzlebigen Radikals. Demnach detektiert man weniger NO in der Messzelle, als zuvor freigesetzt wurde.

Durch die Anwendung der Durchflusszelle (siehe Abb. 43) anstelle des Dreihalskolbens kann dagegen der Verlust an Stickstoffmonoxid weitgehend minimiert und eine Abhängigkeit vom Puffervolumen ausgeschlossen werden. Der durch die Durchflusszelle geleitete Gasstrom durchmischt gleichmäßig die Pufferlösung und sorgt dafür, dass freigesetztes NO schnell in den Gasraum gelangt.

Nachfolgend sind die Eigenschaften der Durchflusszellen zusammengefasst:

- Hohe Reproduzierbarkeit der Messdaten
- Messung der *tatsächlichen* Freisetzungsgeschwindigkeit^{*)}
- Geringe Abhängigkeit vom Puffervolumen
- Kein messbarer Verlust von NO^{*)}
- Praktische Anwendung (Stichworte: Pufferwechsel, Reinigung, Schutz der Spektroskopiezelle; keine Rührvorrichtung notwendig)

Probenmessung

Die Freisetzungszelle wird mit der Pufferlösung gefüllt und anschließend fest verschlossen. Sobald sie mit der LMR-Detektionseinheit verbunden ist, wird die Fließgeschwindigkeit des Transportgases eingestellt (0.8 l/min). 5-10 Sekunden nach dem Start der Aufzeichnung werden 600.0 µl (375 nmol Diazeniumdiolat) der Probenlösung in die Pufferlösung injiziert. Für die Probenzugabe können Insulinspritzen oder Eppendorf-Pipetten benutzt werden.

Das freigesetzte NO wird in der Spektroskopiezelle detektiert, der Verlauf der Liberation kann online auf einem Bildschirm verfolgt werden. Nach Abschluss der Freisetzung können die so erhaltenen Kurven ausgewertet werden.

2.6. Auswertung der Freisetzungsversuche

Die Messung der NO-Konzentration führt zu typischen Freisetzungskurven (*Abb. 47*), die ausgewertet Aufschluss geben über die Freisetzungskinetik der vermessenen Diazeniumdiolate und über die Stoffmenge des freigesetzten NO. Die Kinetik der NONOate wird charakterisiert durch die Geschwindigkeitskonstante bzw. Zerfallshalbwertszeit, die von der Freisetzungskurve jeweils abgeleitet werden können. Die Stoffmenge des freigesetzten NO kann mit Hilfe des Kurvenintegrals bestimmt werden.

2.6.1. Bestimmung der Freisetzungskinetik

Abb. 47 zeigt den typischen Verlauf einer mit Hilfe der LMRS aufgenommenen NO Freisetzungskurve eines Diazeniumdiolats. Dem schnellen Anstieg auf ein Maximum folgt ein langsamer, exponentieller Abfall der NO Konzentration zum Ausgangswert.

^{*)} Voraussetzung dafür ist eine ausreichende Fließgeschwindigkeit des Transportgases. Kapitel 2.7.3. befasst sich ausführlich mit dem Einfluss von Flussrate und Puffervolumen auf die Freisetzungsmessungen.

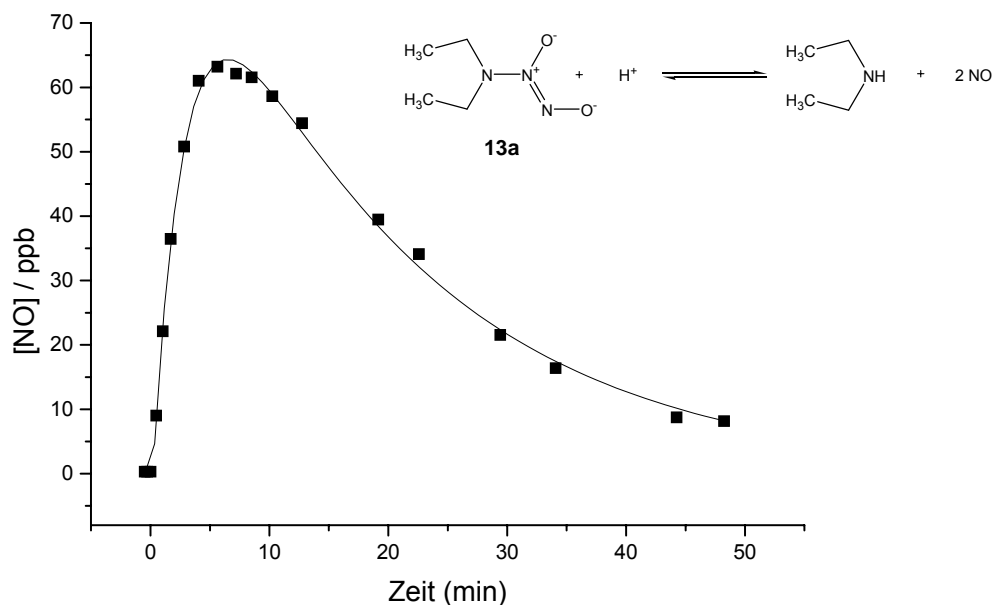


Abb. 47: Typischer Verlauf der NO Freisetzung eines Diazeniumdiolates (hier **13a** bei pH 7.4; 20°C; Dreihalskolben) aufgenommen mit Hilfe der LMRS.

Computergestützt konnte festgestellt werden, dass diese Freisetzungskurven mit der in Abb. 48 dargestellten Puls-Funktion mathematisch beschrieben werden können (Menzel, 2000).

$$f(t) = A \cdot \left(1 - e^{-\frac{t-t_0}{t_1}}\right) e^{-\frac{t-t_0}{t_2}}$$

Abb. 48: Pulsfunktion.

Es stellt sich die Frage, wie diese Funktion zur Berechnung von Zeitkonstanten herangezogen werden kann. Dazu betrachten man zunächst die Reaktionsgleichung der säurekatalysierten Dissoziation von Nonoaten (Abb. 49).

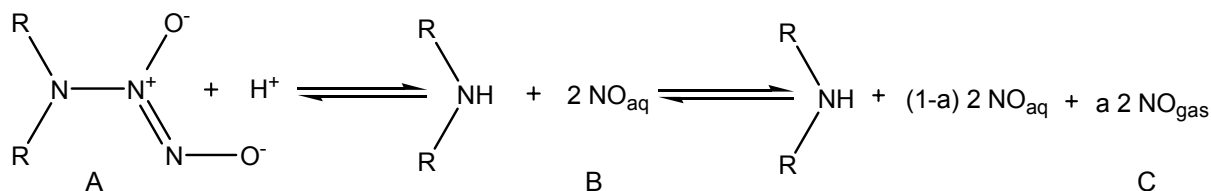


Abb. 49: Säurekatalysierte Dissoziation von NONOaten.

$0 < a < 1$, a: relativer Anteil

Nach der Gleichung verläuft der Prozess der NO Freisetzung in zwei Schritten: Das gelöste Diazeniumdiolat (A) dissoziiert in nicht basischer Lösung zum sekundären Amin und zu zwei Mol gelöstem Stickstoffmonoxid. NO_{aq} (B) bleibt in seiner gelösten Form bis es zur Phasengrenze diffundiert ist. Dort gelangt es in den Gasraum und wird als NO_{gas} (C) zur Detektionszelle transportiert, wobei ein geringer Teil in der Pufferlösung verbleibt (1-a). Die

Konstante a gibt den Anteil von Stickstoffmonoxid an, der nicht in der Lösung verbleibt, sondern vom Trägergas aufgenommen wird. Für beide Schritte wird eine Reaktion erster Ordnung angenommen. Vereinfacht läuft die Reaktion nach *Abb. 50* ab.

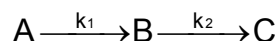


Abb. 50: Allgemeiner Verlauf der NO-Freisetzung. A: gelöstes NONOat. B: NO_{aq} . C: NO_{gas} .

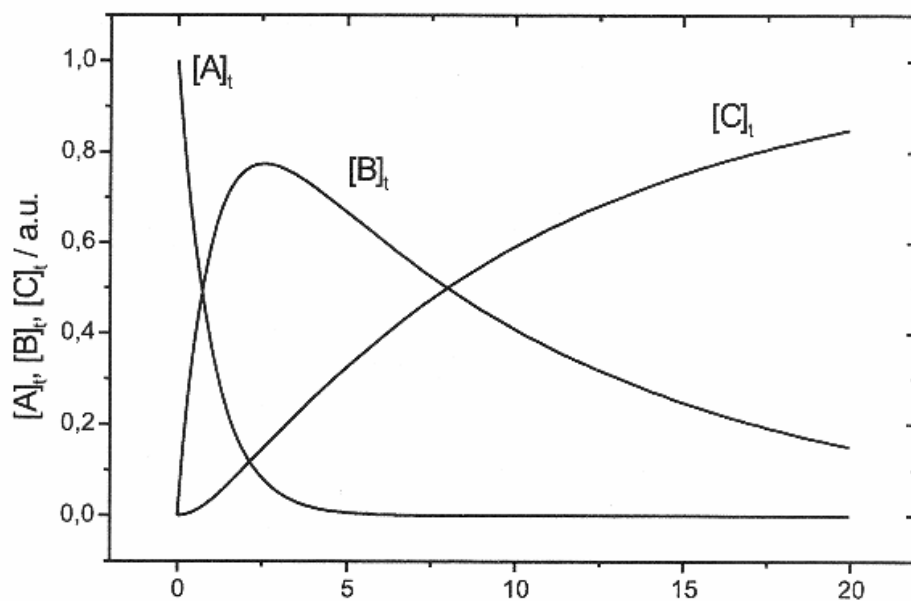
Für Folgereaktionen dieser Art finden sich in der Chemie weitere Beispiele, so der Verlauf des Zerfalls eines radioaktiven Stoffes A zu C mit dem Zwischenprodukt B. In Lehrbüchern der physikalischen Chemie werden zur Berechnung ihrer Konzentrationen die Gleichungen in *Abb. 51* genannt (Atkins, 1990). Ihr graphischer Verlauf ist in *Abb. 52* illustriert.

$$[A]_t = [A]_0 e^{-k_1 t}$$

$$[B]_t = [A]_0 \frac{k_1}{k_2 - k_1} (e^{-k_1 t} - e^{-k_2 t})$$

$$[C]_t = [A]_0 \left(1 + \frac{k_1}{k_2 - k_1} (k_2 e^{-k_1 t} - k_1 e^{-k_2 t}) \right)$$

Abb. 51: Gleichungen zur Berechnung der Konzentration von A, B und C.



*Abb. 52: Darstellung der Graphen von $[A]_t$, $[B]_t$ und $[C]_t$ aus *Abb. 51*.*

Werden die Gleichungen auf die Freisetzungskurven der NONOate übertragen, sollte man gemäß dem zuvor Beschriebenen den Verlauf von $[C]_t$ erhalten. Allerdings verhindert der gleichmäßige Gasfluss durch das offene System die Anreicherung von NO in der Spektroskopiezelle. Die Aufnahme des Spektrums zeigt demnach nicht den graphischen Verlauf von $[C]_t$, sondern gibt vielmehr Auskunft darüber, wie viel NO pro Zeiteinheit in die Gasphase übergeht. Dieser Prozess sollte nach unserer Modellannahme proportional zur Konzentration des Zwischenproduktes $[B]_t$ sein. Die Ähnlichkeit des graphischen Verlaufs von $[B]_t$ in *Abb. 52* mit den gemessenen Freisetzungskurven bestätigt diese Überlegung.

Tatsächlich sind $[B]_t$ (*Abb. 51*) und die Puls-Funktion (*Abb. 48*) identisch, wenn folgende Transformationen durchgeführt werden (Menzel, 2000).

$$k_1 = \frac{1}{t_2}$$

$$k_2 = \frac{1}{t_1} + \frac{1}{t_2}$$

Abb. 53: Geschwindigkeitsparameter.

Demnach kann durch die Auswertung der Konzentrationsprofile in der Gasphase direkt auf den Dissoziationsprozess in der Pufferlösung geschlossen und die Zerfallshalbwertszeiten und Geschwindigkeitskonstanten der NONOate berechnet werden. Dies geschieht durch computergestütztes Anfitten der Liberationskurven mit der Puls-Funktion (Origin 5.0 Microcal®) und Einsetzen des Zeitparameters t_2 in folgende Gleichung zur Berechnung der Zerfallshalbwertszeit ($t_{1/2}$) und der Zeitkonstanten erster Ordnung (k_1).

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_1} = \ln 2 \cdot t_2$$

Abb. 54: Halbwertszeit.

Die Zerfallshalbwertszeit gibt die Zeitspanne an, in der die Konzentration des entsprechenden NO-Donors auf die Hälfte des Anfangswertes abgesunken ist. Mit ihrer Hilfe ist ein Vergleich der Freisetzungsprofile unterschiedlicher NONOate möglich. *Abb. 55* stellt die Berechnung der Zerfallshalbwertszeit anhand eines konkreten Beispiels dar.

2.6.2. Grenzen der Methode

Für ultra-schnell freisetzende Verbindungen (wie **16a** und **16c**), deren Halbwertszeiten aufgrund von Daten bekannter NONOate im Bereich von wenigen Sekunden zu erwarten sind, können in

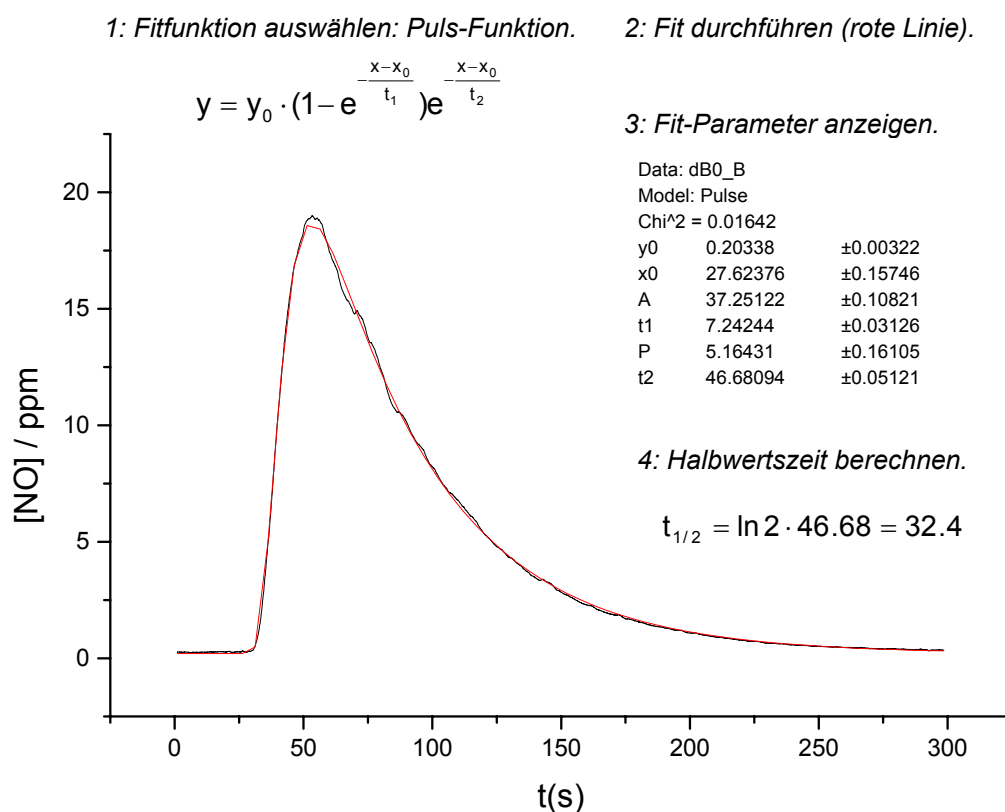


Abb. 55: Beispiel für die Berechnung der Zerfallshalbwertszeit eines Diazeniumdiolates anhand des mit LMRS aufgezeichneten Freisetzungsprofils.

unserer Versuchsanordnung diese kurzen Halbwertszeiten nicht korrekt ermittelt werden. Der Grund liegt im geschwindigkeitsbestimmenden Schritt. Nach diesem Modell ist die Dissoziation des NONOates für die ermittelte Zerfallshalbwertszeit grundsätzlich bestimmend. Bei sehr schneller Dissoziation aber wird der Transport des freigesetzten NO durch Puffer und Gasphase bis zur Detektionszelle geschwindigkeitsbestimmend. In diesem Fall ist der Zeitfaktor t_2 für die Berechnung der Parameter ungeeignet.

Die Zeit, die für den Gastransport benötigt wird, ist umso größer, je geringer die Fließgeschwindigkeit des Transportgases gewählt wird. Mit einer Erhöhung der Fließgeschwindigkeit kann die Transportzeit also verkürzt und die Empfindlichkeit der Methode erhöht werden.

Im anderen Extrem der sehr langsamen NO-Releaser (Verbindungen, die wie **24b** über mehreren Stunden NO freizusetzen vermögen) wird die Nachweismethode durch die Laufleistung des CO-Lasers begrenzt. Sollte die Messung eines *Slow-Releasers* aus diesem Grund vorzeitig abgebrochen werden, ist es möglich, durch Extrapolation die Freisetzungskurve zu ergänzen und anschließend auszuwerten.

2.6.3. Quantitative Auswertung

Die Freisetzungskurven lassen nicht nur eine qualitative sondern auch eine quantitative Auswertung zu. Durch Integration der Kurven und eine nachfolgende Umrechnung lässt sich die Gesamtmenge des freigesetzten NO berechnen. Diese gibt zudem Aufschluss über die Reinheit des eingesetzten NONOates. Damit kann die quantitative Auswertung zur Gehaltsbestimmung der NONOate herangezogen werden.

Die Berechnung der NO-Stoffmenge (in nmol) erfolgt durch die Formel in Abb. 56.

$$\text{NO [nmol]} = \frac{\text{AUC}}{60\text{s} \cdot 22,4 \frac{\text{l}}{\text{mol}}} \cdot 0,8 \frac{\text{l}}{\text{min}} \cdot 1000$$

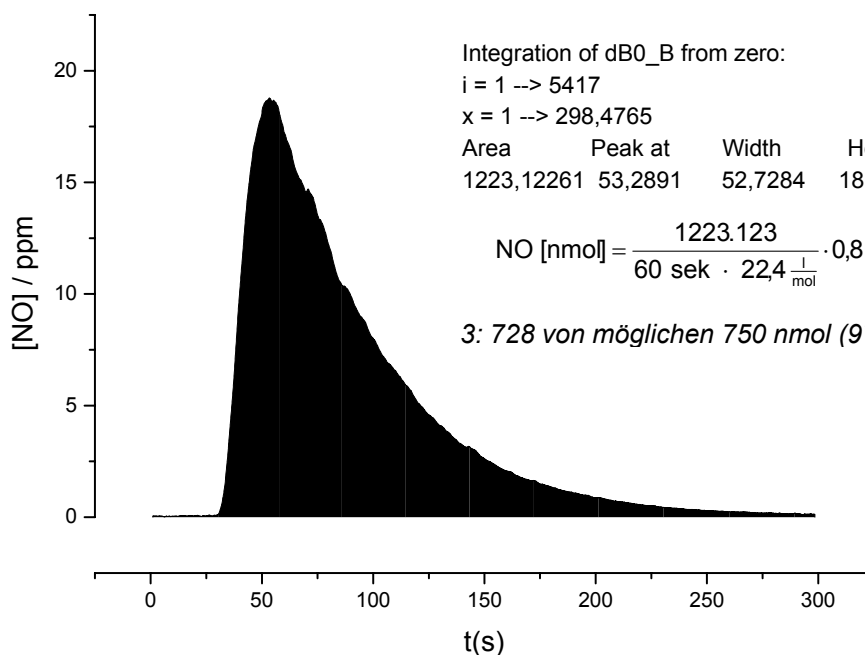
Abb. 56: Formel zur Berechnung der liberierten NO-Stoffmenge (Fließgeschwindigkeit von 0.8 l/min).

Um die liberierte Stoffmenge NO zu erhalten, wird das von Sekunden in Minuten umgerechnete Integral durch das Molvolumen (22.4 l/mol) geteilt und anschließend mit der Fließgeschwindigkeit des Trägergases multipliziert. Mit dem Faktor 1000 wird anschließend in nmol umgerechnet.

Eine Injektion von 600.0 µl der Probenlösung enthält 375 nmol des NONOates, 750 nmol NO können demnach maximal freigesetzt werden. Abb. 57 zeigt anhand eines konkreten Beispiels die computergestützte (Origin 5.0 Microcal®) quantitative Auswertung einer Freisetzungskurve.

1: Freisetzungskurve integrieren.
(AUC schwarz markiert).

2: AUC (entspricht „Area“) in Formel aus Abb. 56 einsetzen.



Integration of dB0_B from zero:

i = 1 --> 5417

x = 1 --> 298,4765

Area	Peak at	Width	Height
1223,12261	53,2891	52,7284	18,7757

$$\text{NO [nmol]} = \frac{1223.123}{60 \text{ sek} \cdot 22,4 \frac{\text{l}}{\text{mol}}} \cdot 0,8 \frac{\text{l}}{\text{min}} \cdot 1000 = 728 \text{ nmol}$$

3: 728 von möglichen 750 nmol (97%) werden detektiert.

Abb. 57: Beispiel für die quantitative Auswertung der Freisetzungskurve eines NONOates.

2.7. Einflussfaktoren der NO-Freisetzung

Das Freisetzungsprofil eines Diazeniumdiolats hängt nicht allein von der Struktur des eingesetzten NO-Donors sondern auch von pH-Wert und Temperatur des Reaktionsmediums ab (Keefer, Nims, Davies, and Wink, 1996). Die Dissoziationsgeschwindigkeit der NONOate in wässrigen Medien kann durch Veränderung der Säurekonzentration und der Temperatur stark variieren.

Neben pH und Temperatur können methodische Parameter den Verlauf der Freisetzungskurven bestimmen. Wie Kapitel 2.3. berichtet, gehören dazu auch die Fließgeschwindigkeit des Trägergases und das Volumen des verwendeten Freisetzungsmediums. Des Weiteren können Größe und Form der verwendeten Freisetzungszellen den Verlauf der Kurven beeinflussen.

Aufgrund der Fülle von Einflussfaktoren ist es schwierig, mit der zuvor beschriebenen Methode reproduzierbare Versuchsergebnisse zu erhalten, es sei denn, die Versuche werden unter standardisierten Bedingungen durchgeführt. Nur eine solche Vorgehensweise ermöglicht es, die Profile der unterschiedlichen NO-Donoren miteinander vergleichen zu können.

In diesem Kapitel werden die Auswirkungen der angesprochenen Einflussfaktoren auf die NO-Liberation der Diazeniumdiolate mit dem Ziel untersucht, ein standardisiertes Verfahren zu entwickeln. Mit Hilfe der LMRS ist man dabei erstmals in der Lage, diesen Einfluss auf den Verlauf des Freisetzungsprofils graphisch darzustellen und damit sichtbar zu machen. Wie Struktur-Freisetzungsbeziehungen liefern diese Untersuchungen wichtige Informationen über die Anwendung von NONOaten bei physiologischen Bedingungen (im pharmakologischen Experiment), die Stabilität der Verbindungen bei Herstellung und Lagerung, die Stabilität der Stamm- und Probenlösungen und den Zerfallsmechanismus der NO-Donoren (siehe (Davies, Wink, Saavedra, and Keefer, 2001)).

2.7.1. pH-abhängige NO-Freisetzung

Die Zersetzung von Diazeniumdiolaten in wässrigen Medien wird über die Protonierung des Anions gesteuert (siehe Abb. 49). Ist die Säurekonzentration durch den Einsatz eines Puffers konstant, beobachten wir eine Kinetik pseudo-erster Ordnung (eine von der Konzentration des NONOats abhängige Dissoziationsgeschwindigkeit).

Wird eine Verbindung in Pufferlösungen verschiedener pH-Werte zur Freisetzung gebracht, steigt die beobachtete Geschwindigkeitskonstante proportional mit der Säurekonzentration. Die ermittelten Geschwindigkeitskonstanten ergeben - aufgetragen gegen die Protonenkonzentration - eine Gerade: den $k/[H^+]$ -Plot (Abb. 61).

In Abb. 58 - Abb. 60 sind die Liberationsprofile verschiedener NONOate dargestellt, die jeweils bei pH-Werten von 6.0, 7.4 und 8.0 in einer Durchflusszelle zur Freisetzung gebracht wurden. Allgemein gilt: Je kleiner der pH-Wert des gewählten Puffermediums desto höher liegt das beobachtete Liberationsmaximum der Graphen und desto steiler fällt die Kurve nach dem Maximum wieder ab. Näher betrachtet erkennt man, dass die in Abb. 58 und in Abb. 59 gezeigten Graphen jeweils ein ähnliches Profil aufweisen. Die in Abb. 60 dargestellten Graphen weichen mit einem flacheren Verlauf der Freisetzungskurven vor allem bei pH 7.4 und 8.0 deutlich davon ab. Die Ursache dafür ist in den Freisetzungseigenschaften der Verbindungen zu suchen: Verbindungen **21g** und **23b** sind im Gegensatz zu **21a** ultraschnelle NO-Donoren. Dieser Unterschied wird im $k/[H^+]$ -Plot der drei Verbindungen offensichtlich (Abb. 61).

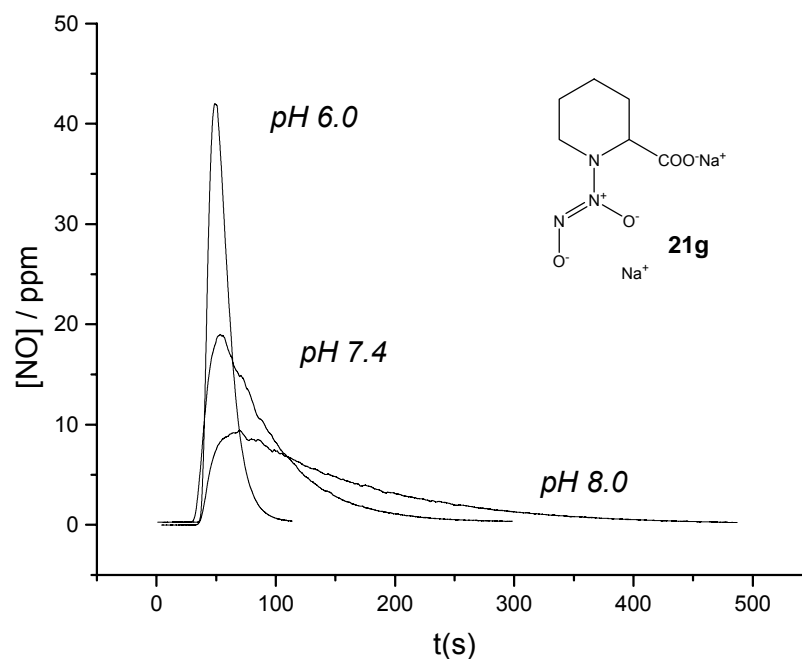


Abb. 58: Darstellung der Freisetzungsprofile von **21g** bei pH-Werten von 6.0, 7.4 und 8.0. Die zugehörigen Zerfallshalbwertszeiten sind Tab. 8 im Ergebnisteil zu entnehmen.

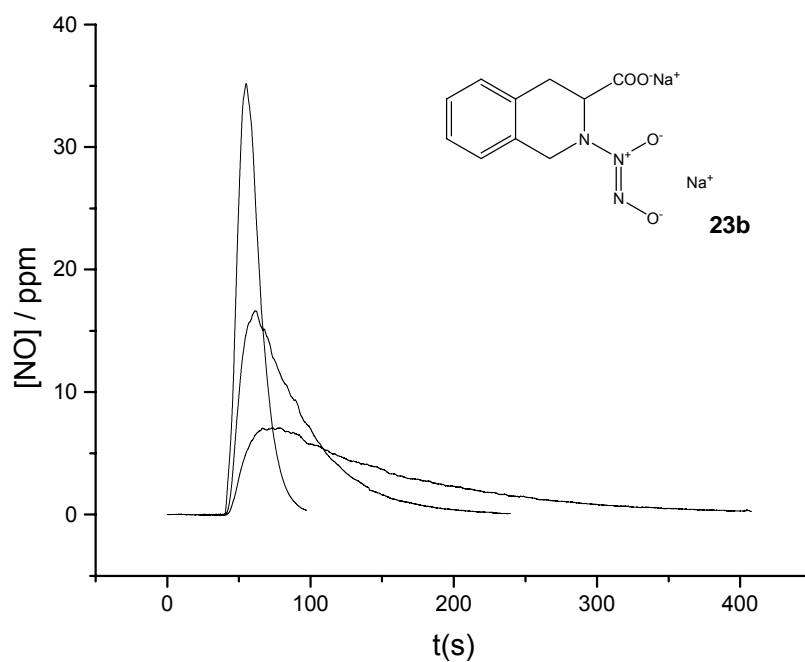


Abb. 59: Darstellung der Freisetzungsprofile von **23b** bei pH-Werten von 6.0, 7.4 und 8.0. Die zugehörigen Zerfallshalbwertszeiten sind Tab. 8 im Ergebnisteil zu entnehmen.

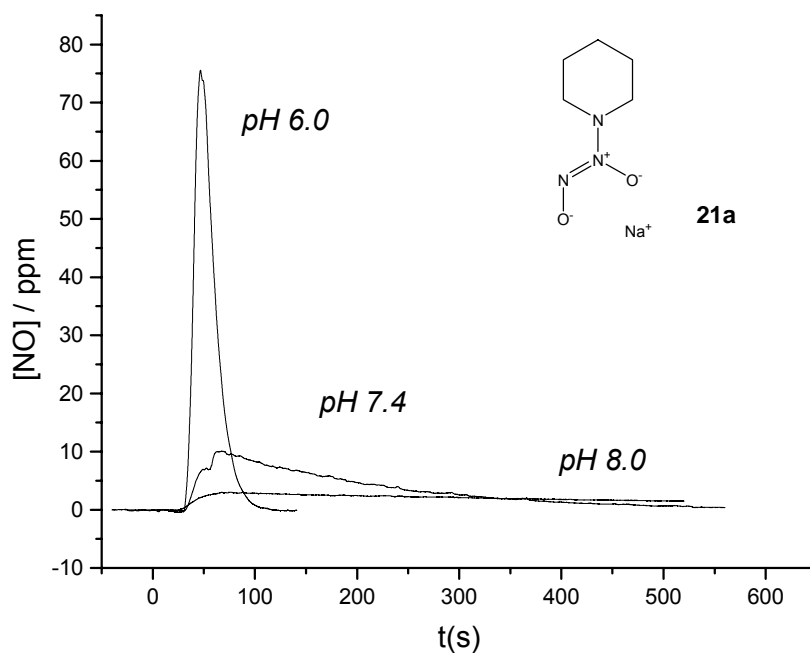


Abb. 60: Darstellung der Freisetzungsprofile von **21a** bei pH-Werten von 6.0, 7.4 und 8.0. Die zugehörigen Zerfallshalbwertszeiten sind Tab. 8 im Ergebnisteil zu entnehmen.

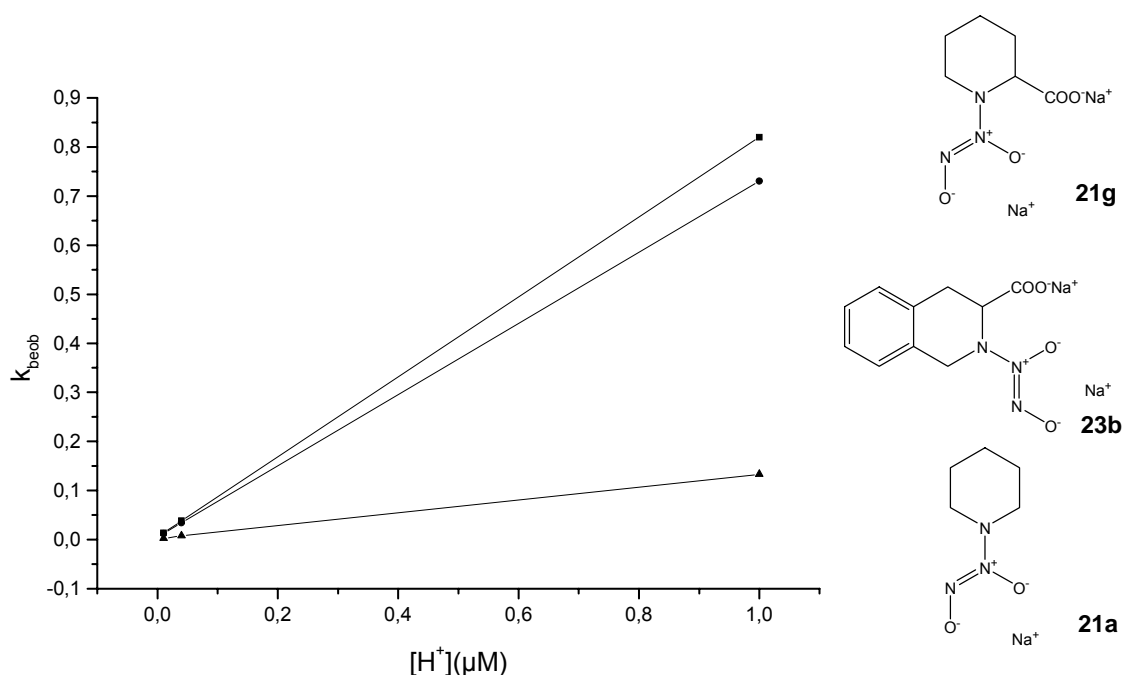


Abb. 61: $k/[H^+]$ -Plot der Verbindungen **21g**, **23b** und **21a** (von oben nach unten). Die Geschwindigkeitskonstanten der Verbindungen bei pH 6.0, 7.4 und 8.0 werden gegen die Protonenkonzentration aufgetragen. **21g** und **23b** sind ultraschnelle NO-Donoren.

Durch die Darstellung der $k/[H^+]$ -Plots verschiedener Diazeniumdiolate ist man in der Lage, Rückschlüsse auf das Freisetzungspotential der im Arbeitskreis synthetisierten NO-Donoren zu ziehen. In Kapitel 2.8. werden die $k/[H^+]$ -Plots der synthetisierten NONOate dargestellt und diskutiert.

2.7.2. Temperaturabhängige NO-Freisetzung

Wird die Temperatur des Freisetzungsmediums erhöht, ist ein Anstieg der Dissoziationsgeschwindigkeit der NONOate zu beobachten. Schon geringe Temperaturschwankungen können dazu führen, dass ermittelte Zerfallshalbwertszeiten und Geschwindigkeitskonstanten verfälscht werden. Daher ist es für die Entwicklung eines standardisierten Verfahrens wichtig, Freisetzungsversuche bei konstanten Temperaturen durchzuführen.

In der Literatur sind bislang kaum Untersuchungen zur Kinetik der thermischen Zersetzung von NONOaten veröffentlicht worden. Mit Hilfe der LMRS ist man indes in der Lage, den Einfluss der Temperatur auf das Freisetzungsprofil der NONOate zu verfolgen. Abb. 62 bis Abb. 64 zeigen die Freisetzungsprofile verschiedener NONOate, die bei unterschiedlichen Temperaturen im Phosphatpuffer (pH 7.4) aufgezeichnet wurden. Deutlich sind die

Auswirkungen der Temperaturveränderungen im Freisetzungprofil zu erkennen. Anstieg und Abfall der NO-Freisetzung verlaufen bei höheren Temperaturen steiler, das Maximum ist erhöht. In Abb. 62 ist zu sehen, dass durch Abkühlen des Puffermediums auf 0°C die NO-Freisetzung erheblich verzögert wird. Die Haltbarkeit von Stamm- und Prüflösungen kann daher durch Lagerung bei 2 bis 8°C erheblich verlängert werden (zur Herstellung von Stamm- und Prüflösungen siehe Kapitel 2.5.).

Umgekehrt zeigt Abb. 63, dass eine Temperaturerhöhung von 20 auf 37°C zu einem Anstieg der Freisetzungsgeschwindigkeit um das Sechsfache führen kann. Eine Verdoppelung der NO-Freisetzungsgeschwindigkeit erfolgt hier bereits bei einer Temperaturerhöhung von 20 auf 25°C. Zerfallshalbwertszeit eines NONOates sollten daher grundsätzlich mit pH und Temperatur angegeben werden.

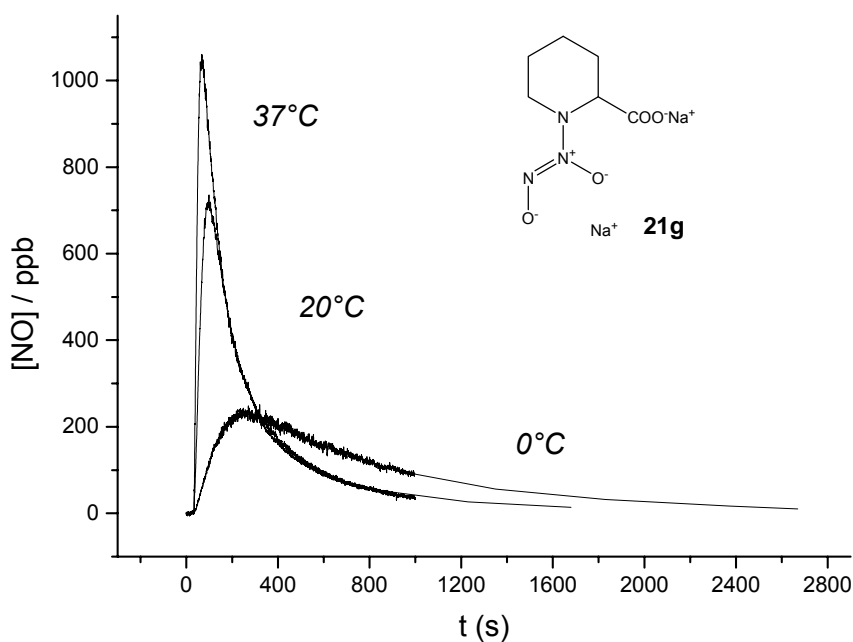


Abb. 62: Freisetzungskurven von **21g**, die im Dreihalskolben bei Puffertemperaturen von 0, 20 und 37°C (pH7.4) aufgenommen wurden.

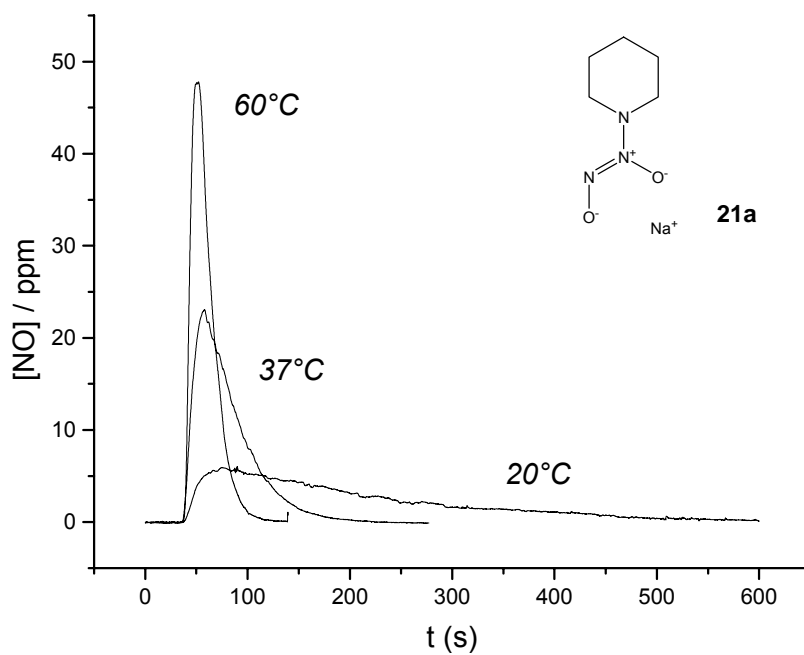


Abb. 63: Freisetzungskurven von **21a**, die in der Durchflussszelle bei Puffertemperaturen von 20, 37 und 60°C (pH7.4) aufgenommen wurden.

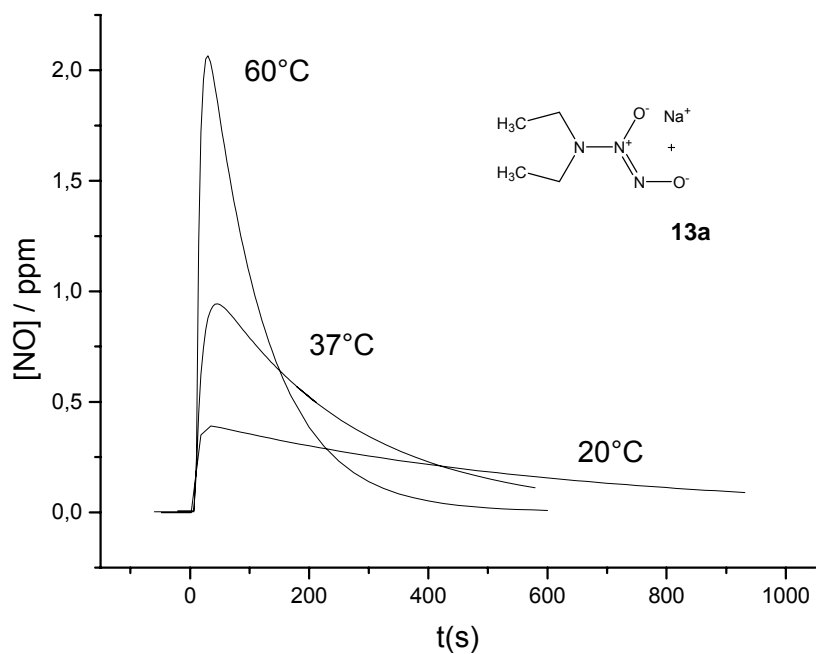


Abb. 64: Freisetzungskurven von **13a**, die in der Durchflussszelle bei Puffertemperaturen von 20, 37 und 60°C (pH7.4) aufgenommen wurden (Fitfunktionen).

2.7.3. NO-Freisetzung in Abhängigkeit von Fließgeschwindigkeit und Puffervolumen

Fließgeschwindigkeit und Puffervolumen haben im Gegensatz zu pH, Temperatur und molekularer Struktur keinen Einfluss auf die *tatsächliche* Dissoziationsgeschwindigkeit des NONOat-Moleküls. Das mit der Durchflusszelle *aufgezeichnete* NO-Freisetzungsprofil variiert dagegen stark bei unterschiedlicher Fließgeschwindigkeit. Dies geschieht, weil das Trägergas die Durchmischung der Pufferlösung und den Transport des NO aus der Lösung in die Gasphase weg zur „downstream“ angeordneten Messzelle bewirkt.

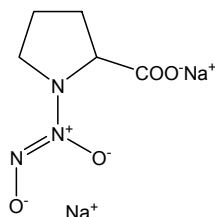
Schon jetzt sei angemerkt, dass bei einer Fließgeschwindigkeit 0 kein NO in der Messzelle registriert würde (obwohl es natürlich in der Freisetzungszelle entsteht). Dieser Überlegung folgend müsste die tatsächliche Halbwertszeit bei einer unendlich schnellen Fließgeschwindigkeit gemessen werden können. Da letzteres nicht möglich ist, wird zu prüfen sein, ob eine Extrapolation der Zeitkonstanten bei verschiedenen Flussraten die *tatsächliche* Halbwertszeit liefern kann.

Des Weiteren ist bekannt, dass die *gemessene* Dissoziationsgeschwindigkeit von NONOaten im Dreihalskolben vom Puffervolumen abhängig ist (siehe Kapitel 2.5). Daher soll geklärt werden, ob auch in der Durchflusszelle eine Veränderung des Puffervolumens zu verschiedenen Freisetzungsprofilen führt.

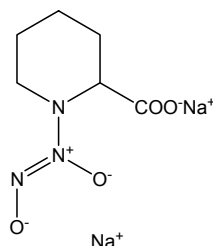
Aus diesen Gründen wurden methodenabhängig die Veränderungen des Freisetzungsprofils durch die Variation von Fließgeschwindigkeit bzw. Puffervolumen untersucht.

Untersuchungen zur Fließgeschwindigkeit

Die Freisetzungsversuche wurden in der Durchflusszelle nach der allgemeinen Versuchsvorschrift in Kapitel 2.5. durchgeführt. Aufgrund kurzer Zerfallshalbwertszeiten bei 20°C und pH 7.4 wurden für die Versuche die zyklischen Diazeniumdiolate **16c** und **21g** [$t_{1/2}$ (**16c**): 13s; $t_{1/2}$ (**21g**): 30s] ausgewählt. Damit konnte der Aufwand für Versuchsdurchführung und Auswertung minimiert werden.



16c



21g

In zwei Versuchsreihen wurden beide Verbindungen unter konstanten Bedingungen (pH 7.4; 25°C) wiederholt zur Freisetzung gebracht, wobei die Fließgeschwindigkeit - mit einer Einstellung von 30-40 ml/min beginnend - jeweils um ca. 40 ml/min erhöht wurde, bis 240-260 ml/min erreicht wurden. Der Gasfluss wurde mit Hilfe von Ventilen manuell eingestellt und mit einem der Versuchszelle vorgeschalteten Messgerät exakt bestimmt. Die Versuche wurden mit Puffervolumina von 10, 30, 60 und 90 ml (**16c**) bzw. 30ml (**21g**) durchgeführt. Die aufgezeichneten Freisetzungskurven wurden ausgewertet (siehe *Abb. 65*), die gemessenen Zerfallshalbwertszeiten und Zeitkonstanten in *Tab. 6* und *Tab. 7* (siehe Seiten 71ff) dargestellt.

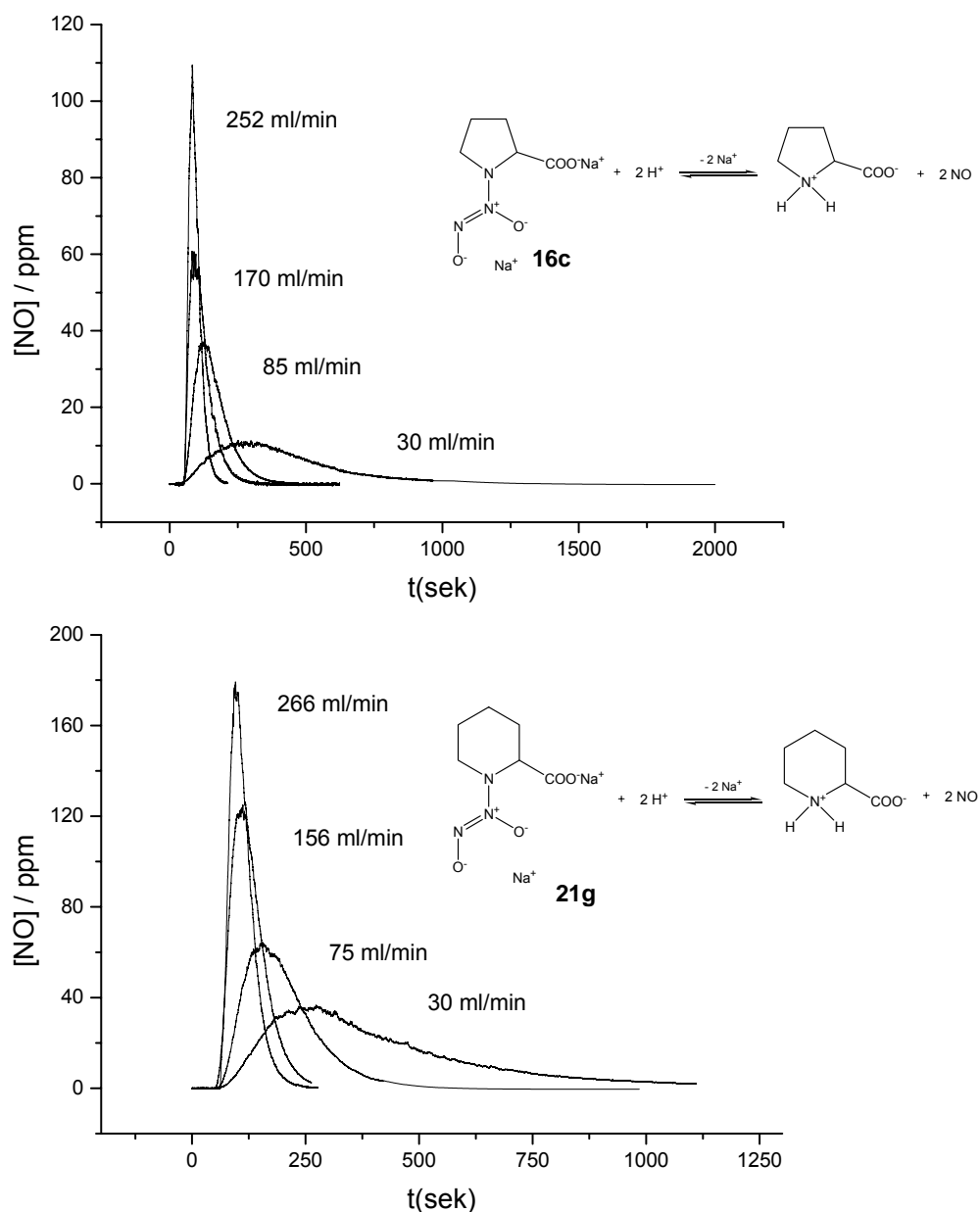


Abb. 65: Freisetzungskurven von 16c und 21g aufgenommen bei den angegebenen Fließgeschwindigkeiten von 30, 85, 170 und 252 ml/min (30ml Phosphatpuffer pH 7.4; 25°C). Die ermittelten Halbwertszeiten werden in den Tab. 6 und Tab. 7 dargestellt.

Trägt man die bei verschiedenen Puffervolumina erhaltenen Geschwindigkeitskonstanten (k) von **16c** gegen die Fließgeschwindigkeit auf, erhält man die in Abb. 66 dargestellte Grafik. In diesem Bereich stehen k und Fließgeschwindigkeit scheinbar in einem linearen Zusammenhang. Werden die Werte jedoch durch Reaktionskonstanten, die bei 800 ml/min gemessen wurden, ergänzt, zeigt sich, dass die Werte bei höheren Fließgeschwindigkeiten von der Linearität abweichen und sich einem Maximalwert (Grenzwert) annähern (Abb. 67).

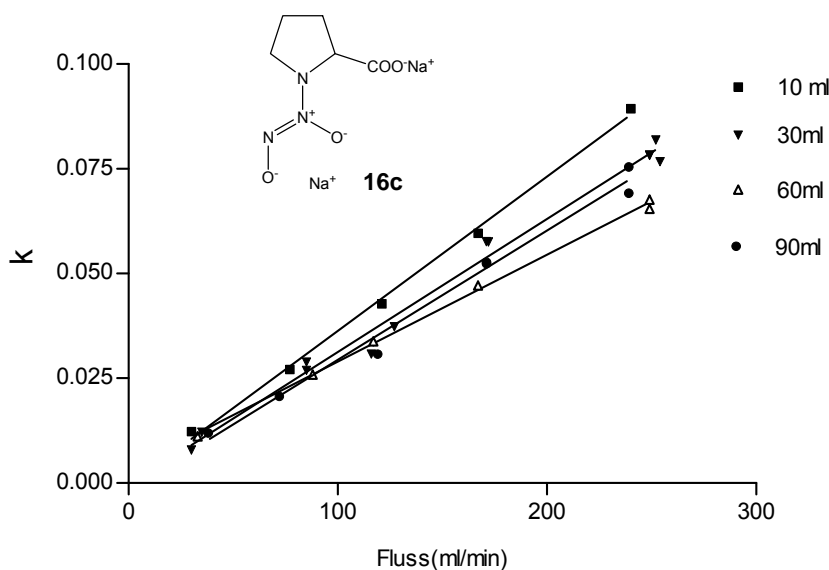


Abb. 66: Aus Freisetzungskurven der Verbindung **16c** abgeleitete Reaktionskonstanten für Puffervolumina von 10, 30, 60 und 90 ml dargestellt in Abhängigkeit von der Fließgeschwindigkeit (25°C). Die Tabelle zeigt Parameter der linearen Regressionen.

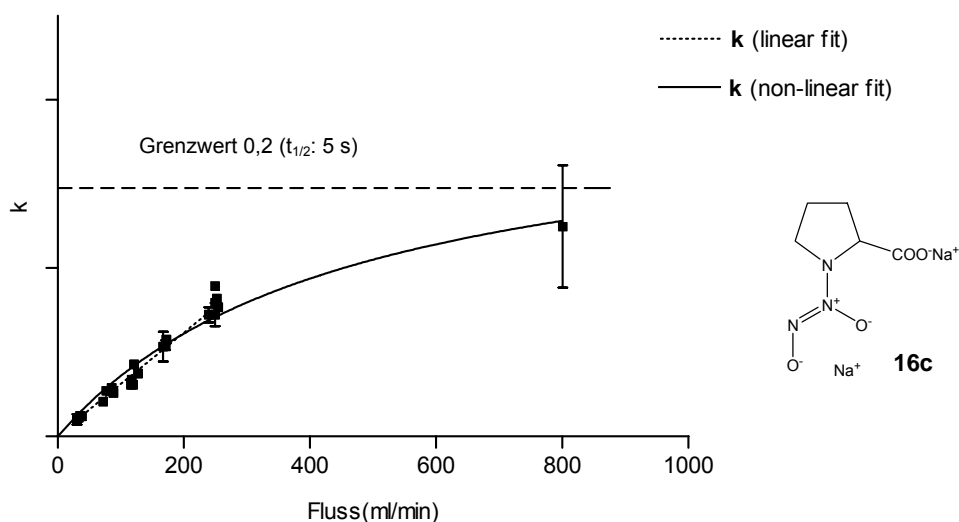


Abb. 67: Reaktionskonstanten von **16c** aus Abb. 66 ergänzt durch Werte bei 800 ml/min (30ml Phosphatpuffer pH 7.4; 25°C). Lineare und nicht-lineare Regression im Vergleich. Annäherung an die tatsächliche Reaktionskonstante (Grenzwert: $0,2 \text{ s}^{-1}$; $t_{1/2}$: 5 s) bei steigenden Flussraten.

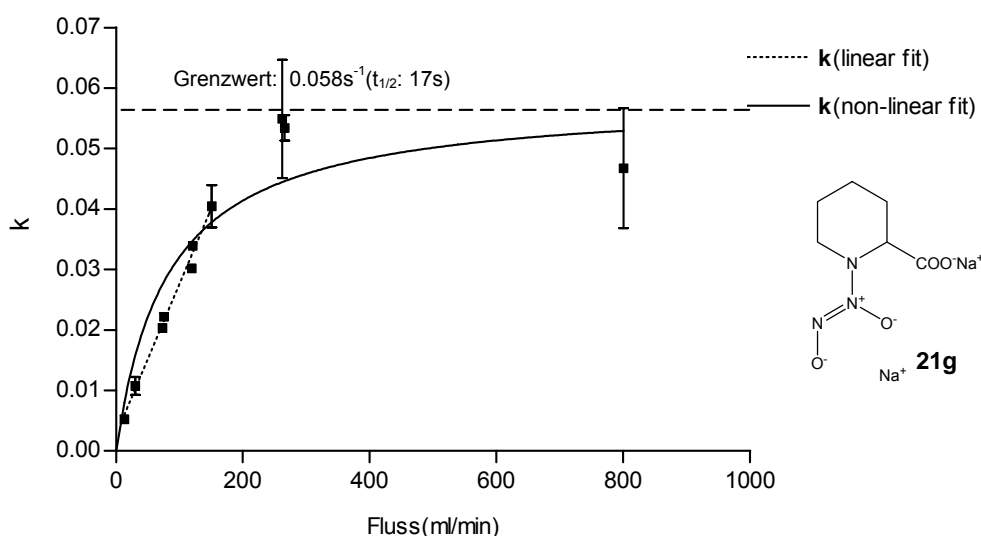


Abb. 68: Reaktionskonstanten von **21g** (aus Tab. 7) ergänzt durch Werte bei 800 ml/min (30ml Phosphatpuffer pH 7.4; 25°C). Lineare und nicht-lineare Regression im Vergleich. Annäherung an die tatsächliche Reaktionskonstante bei steigenden Flussraten (Grenzwert: 0.058s^{-1} ; $t_{1/2}$: 17 s).

Auch bei **21g** ist bis zu einer Fließgeschwindigkeit von 200 ml/min ein linearer Zusammenhang zwischen Fluss und k zu beobachten. Schon bei 260 ml/min weicht k von dieser Linearität ab und nähert sich einem Grenzwert an (Abb. 68).

Wie eingangs vermutet ist die Grenzwertannäherung bei beiden Versuchsreihen darauf zurückzuführen, dass die *gemessene* Dissoziationsgeschwindigkeit des NONOates (die nach Kapitel 2.6. der NO-Freisetzungsgeschwindigkeit proportional ist) nicht der *tatsächlichen* Zersetzungsgeschwindigkeit im Puffermedium entspricht. Vielmehr setzt sie sich aus der *tatsächlichen* Dissoziationsgeschwindigkeit und der Transportgeschwindigkeit, mit der das freigesetzte NO durchschnittlich zur Messzelle befördert wird, zusammen. Die Transportgeschwindigkeit ist abhängig von der Fließgeschwindigkeit.

Durch die in diesen Versuchen durchgeführte schrittweise Erhöhung des Gasflusses kann man sich einer maximalen *gemessenen* Zersetzungsgeschwindigkeit (ausgedrückt durch die Geschwindigkeitskonstante k) annähern. Die Reaktionskonstanten steigen wie gesehen zunächst proportional mit der Flussrate an, weichen dann jedoch von der Linearität ab, um sich einem Maximalwert anzunähern.

Dieser Grenzwert, der durch eine computergestützte Kurvenanpassung ermittelt werden kann (*Prism™*, GraphPad Software Inc. San Diego, CA, USA) entspricht näherungsweise der *tatsächlichen* Geschwindigkeitskonstanten bzw. -halbwertszeit, da durch die Erhöhung der Flussrate die Verzögerung durch den Gastransport vernachlässigbar gering wird. Mit Hilfe der hier beschriebenen Methode ist man also in der Lage, sich der *tatsächlichen* Zersetzungsgeschwindigkeit zu nähern.

Vergleicht man die in dieser Arbeit dargestellten Halbwertszeiten mit den hier bestimmten Grenzwerten für $t_{1/2}$, so ist festzustellen, dass für die Ermittlung der *tatsächliche* Zersetzungshalbwertszeit eine Fließgeschwindigkeit von 800 ml/min nicht ausreicht. Folglich stellen Halbwertszeiten und Reaktionskonstanten, die bei 800 ml/min ermittelt wurden, nur dann repräsentative Stoffkonstanten dar, wenn man eine Standardisierung vornimmt. Ein Vergleich der Daten ist daher lediglich bei konstanten Flussraten zulässig. Mit einer ausreichend hohen Fließgeschwindigkeit sollte es sogar möglich sein, direkt die *tatsächliche* Zersetzungsgeschwindigkeit zu erhalten.

In zukünftigen Versuchen sollte geklärt werden, ob ein allgemeingültiger Faktor bestimmt werden kann, mit dessen Hilfe die Umrechnung von *gemessener* zu *tatsächlicher* Dissoziationsgeschwindigkeit möglich ist.

Neben der Berechnung der Dissoziationskonstanten wurden zusätzlich quantitative Auswertungen der in Abb. 65 dargestellten Freisetzungskurven unternommen. Die pro Freisetzung in der LMR-Messzelle registrierte NO-Stoffmenge wurde dabei mit der theoretisch freizusetzenden Stoffmenge des Radikals ins Verhältnis gesetzt.

Die in Prozent angegebenen Werte der gemessenen NO-Konzentration sind in Tab. 7 aufgeführt. Sie wurden in Abb. 69 gegen die Flussrate aufgetragen und mit Hilfe einer computergestützten Kurvenanpassung gefittet (*PrismTM*, GraphPad Software Inc. San Diego, CA, USA).

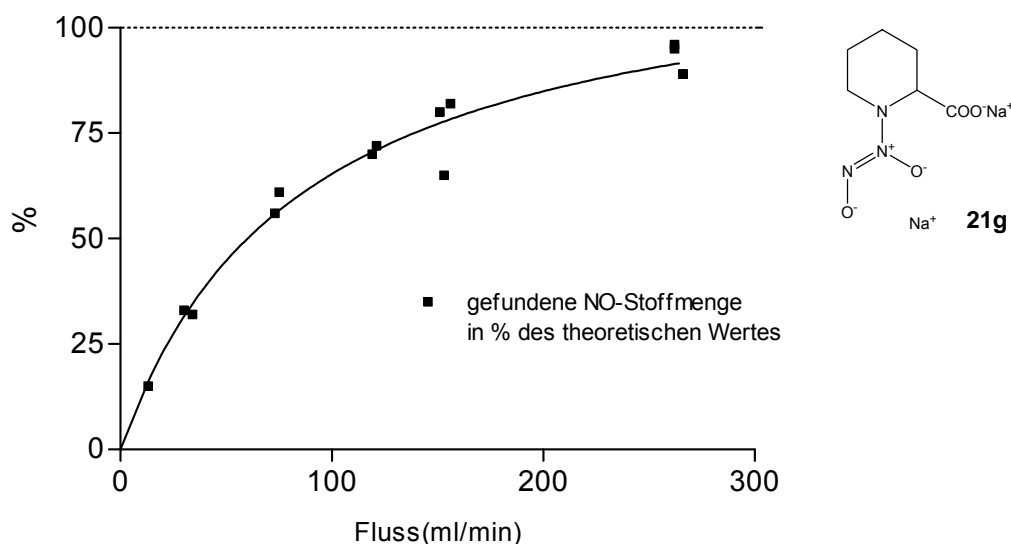


Abb. 69: Detektierte NO-Stoffmenge der Liberationsversuche der Verbindung **21g** (Tab. 6) aufgetragen gegen die jeweils eingestellte Fließgeschwindigkeit (Stoffmenge angegeben in Prozent des theoretischen Werts).

Abb. 69 zeigt: mit steigender Fließgeschwindigkeit erhöht sich die in der Messzelle registrierte NO-Konzentration, diese nähert sich in exponentiellem Verlauf dem 100%-Wert an. Der Verlust an freigesetztem NO ist demnach umso geringer, je höher die Flussrate gewählt wird. Bei einer Standardflussrate von 800ml/min stimmen freigesetzte und gemessene NO-Konzentration überein.

Daher lassen - eine ausreichende Fließgeschwindigkeit vorausgesetzt - quantitative Auswertungen der Freisetzungskurven Rückschlüsse auf die Reinheit der eingesetzten NONOate zu.

Untersuchung des Puffervolumens

Zur Untersuchung des Parameters Puffervolumen wurden die bei Flussraten von 30, 170 und 249 ml/min in der Durchflusszelle gemessenen Geschwindigkeitskonstanten von **16c** in Abb. 70 gegen die eingesetzten Puffervolumina aufgetragen.

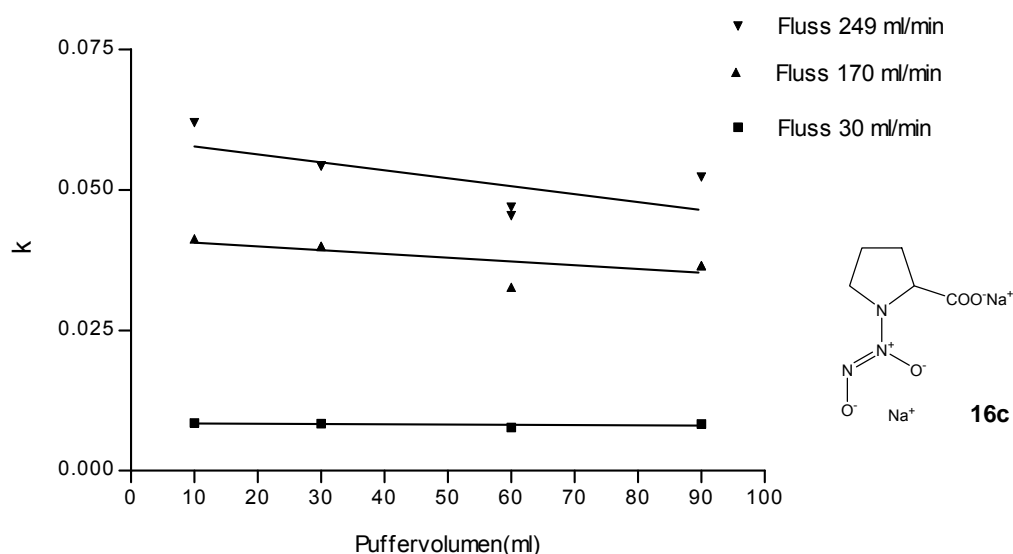


Abb. 70: Einfluss des Puffervolumens bei Freisetzungsversuchen mit **16c** in der Durchflusszelle (25°C; pH 7.4). Aufgetragen wurden die Reaktionskonstanten der Freisetzungsversuche, die bei Flussraten von 249, 170 und 30 ml/min gemacht wurden.

Aus Abb. 70 geht hervor, dass die Messung in der Durchflusszelle unabhängig vom eingesetzten Puffervolumen ist. Der Weg des freigesetzten NO vom Puffermedium in die Gasphase wird hier durch das durch die Lösung strömende Transportgas stark verkürzt. Schon bei 30ml/min kommt es durch eine Erhöhung des Puffervolumens zu keiner nennenswerten Verschiebung der Geschwindigkeitskonstanten.

Der fehlende Gasstrom durch die Lösung ist im Übrigen die Ursache für die extreme Volumenabhängigkeit der Freisetzungsmessungen im Dreihalskolben. Abb. 71 zeigt, dass bei dieser Methode durch eine Erhöhung des Puffervolumens von 10 ml auf 100 ml die Freisetzungsgeschwindigkeit um den Faktor 5 verlangsamt wird.

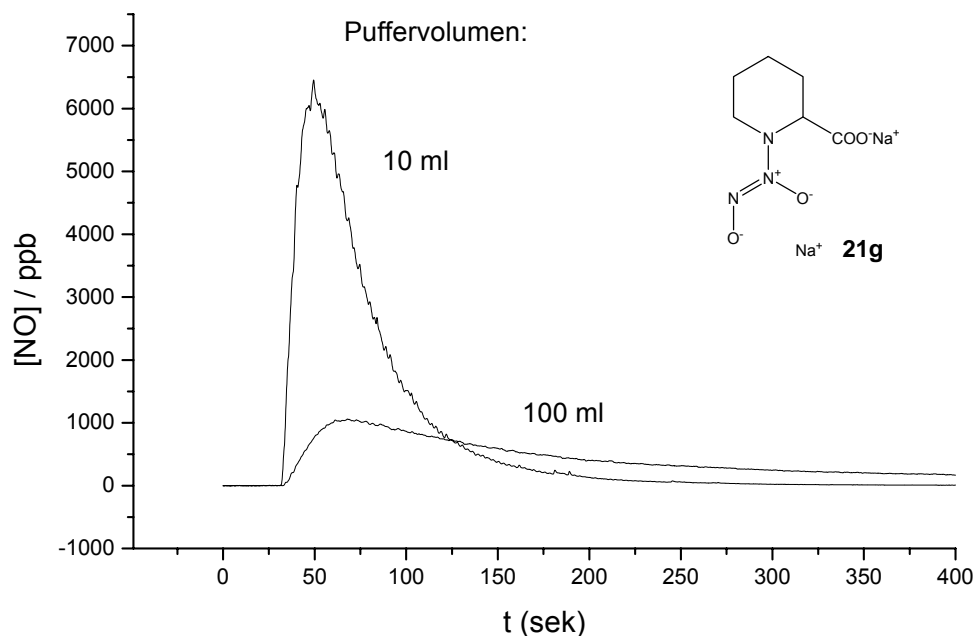


Abb. 71: Liberation im Dreihalskolben: Freisetzungskurven von **21g** aufgenommen bei 10 und 100 ml Phosphatpuffer (pH 7.4; 37°C). $t_{1/2}(10\text{ml})$: 19s; $t_{1/2}(100\text{ml})$: 95s.

Tab. 6: Halbwertszeiten und Geschwindigkeitskonstanten von **16c** (pH 7.4; 20°C) aufgenommen bei verschiedenen Fließgeschwindigkeiten und Puffervolumina (Durchflussszelle).

Messung	Volumen (ml)	Fluss (ml/min)	$t_{1/2}^a$ (s)	k^b (s ⁻¹)
1	10	30	81	0,0123
2	10	77	37	0,0271
3	10	121	23	0,0428
4	10	170	17	0,0596
5	10	249	11	0,0894
6	30	30	126	0,0079
7	30	35	82	0,0121
8	30	85	37	0,0269
9	30	85	35	0,0289
10	30	116	33	0,0308
11	30	127	27	0,0373
12	30	170	17	0,0575
13	30	170	17	0,0576
14	30	249	13	0,0782
15	30	249	13	0,0782
16	30	252	12	0,0819
17	30	254	13	0,0767

Messung	Volumen (ml)	Fluss (ml/min)	$t_{1/2}^a$ (s)	k^b (s ⁻¹)
18	60	30	90	0,0111
19	60	88	39	0,0259
20	60	117	30	0,0338
21	60	170	21	0,0471
22	60	249	15	0,0676
23	60	249	15	0,0655
24	90	30	83	0,0120
25	90	72	48	0,0207
26	90	119	32	0,0308
27	90	170	19	0,0524
28	90	170	19	0,0527
29	90	239	14	0,0692
30	90	249	13	0,0755

^a Zerfallshalbwertszeit der Nonoate in Sekunden

^b Geschwindigkeitskonstante ($1/t_{1/2}$)

Tab. 7: Halbwertszeiten und Geschwindigkeitskonstanten von **21g** (pH 7.4; 20°C) aufgenommen bei unterschiedlichen Fließgeschwindigkeiten und Puffervolumina (Durchflusszelle).

Messung	Volumen (ml)	Fluss (ml/min)	n(NO) ^c [nmol]	% ^d	t _{1/2} ^a (s)	k ^b (s ⁻¹)
1	30	13	142	15	194	0,0052
2	30	30	320	33	103	0,0097
3	30	34	306	32	85	0,0118
4	30	73	540	56	49	0,0203
5	30	75	586	61	45	0,0222
6	30	119	677	70	33	0,0302
7	30	121	694	72	30	0,0339
8	30	151	774	80	25	0,0408
9	30	153	632	65	27	0,0368
10	30	156	794	82	23	0,0438
11	30	262	917	95	21	0,0480
12	30	262	929	96	16	0,0618
13	30	266	859	89	18	0,0549
14	30	266	863	89	19	0,0519

^a Zerfallshalbwertszeit der Nonoate in Sekunden

^b Geschwindigkeitskonstante (1/t_{1/2})

^c absolute Stoffmenge des detektierten NO

^d relative auf den theoretischen Wert (750 nmol) bezogene Stoffmenge in Prozent

2.7.4. NO Freisetzung in Gegenwart von Thiolen

Neben pH-Wert, Temperatur und Freisetzungsmethode kann auch die Gegenwart bestimmter Substanzen das NO-Freisetzungsprofil aus NONOaten beeinflussen. Dabei handelt es sich in der Regel um Stoffe, die mit dem liberierten Stickstoffmonoxid im Freisetzungsmedium reagieren und damit die im Gasraum detektierte Stoffmenge verringern. Zu ihnen zählen die SH-haltigen Thiole.

Die Reaktion von NO mit Thiolen wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Die Annahme einer reversiblen Addition von NO an SH-Gruppen, die zur Bildung von S-Nitrosothiolen führt, kann nicht bestätigt werden. Vielmehr werden durch die direkte Reaktion beider Verbindungen Thioldisulfide und HNO gebildet (Abb. 72). Der Synthese der S-Nitrosothiole muss eine Oxidation des Stickstoffmonoxids gemäß Abb. 72 vorausgehen. Erst das kurzlebige Distickstofftrioxid hat nitrosierende Eigenschaften und ermöglicht die Bildung von S-Nitrosothiolen, die in vivo als Speicher- und Transportform des NO angesehen werden.

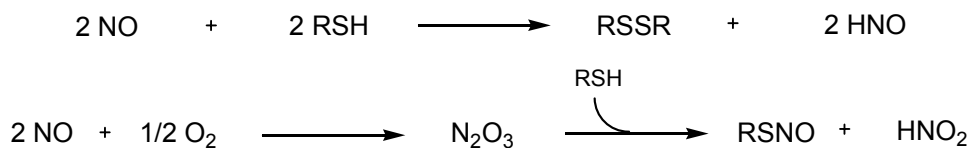


Abb. 72: Reaktion von NO mit SH-gruppenhaltigen Verbindungen.

Mit Hilfe der in Kapitel 2.3 beschriebenen Versuchsanordnung ist man in der Lage, den Einfluss der Thiole auf die NO-Freisetzung der NONOate zu untersuchen. Um einen signifikanten Unterschied der Freisetzungsprofile beobachten zu können, muss allerdings ein 10^3 -facher Überschuss des Thiols eingesetzt und die Verweildauer des NO in der Lösung erhöht werden. Letzteres erreicht man durch den Einsatz eines *slow-releasers*, der im Dreihalskolben zur Freisetzung gebracht wird.

In Abb. 73 werden Freisetzungskurven, die mit **24b** in Gegenwart von Cysteinmethylester im Dreihalskolben aufgenommen wurden, dargestellt. Profile bei Konzentrationen von 0.033 M und 0.066 M Cysteinmethylester werden einer Freisetzungskurve ohne Thiolzusatz gegenübergestellt.

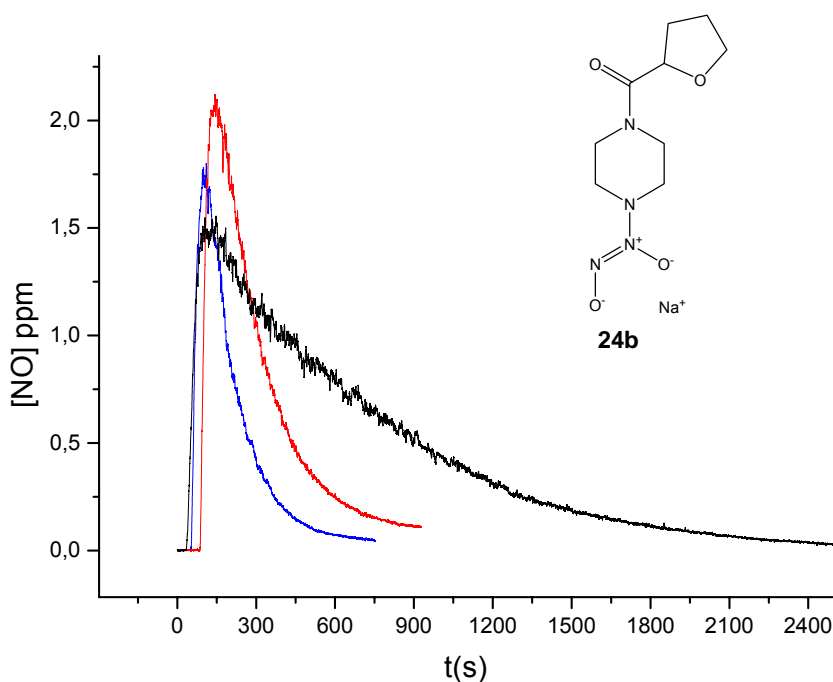


Abb. 73: Freisetzungsprofile von **24b** in Gegenwart von Cysteinmethylester. Die Abbildung zeigt drei Freisetzungskurven (Dreihalskolben). Schwarze Linie (Blindprobe): $3.75 \cdot 10^{-5} \text{ mol/l}$ **24b**. Rote Linie: $3.75 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ **24b** plus $3.3 \cdot 10^{-2} \text{ M}$ Cysteinmethylester. Die quantitative Auswertung erbrachte nur noch 49% des ursprünglich gemessenen NO. Blaue Linie: $3.75 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ **24b** plus $6.6 \cdot 10^{-2} \text{ M}$ Cysteinmethylester. Es konnten nur noch 28% der Blindprobe detektiert werden.

Durch einen Überschuss an Cysteinmethylester kommt es zu einem schnelleren Abfall des Graphen und damit zu einer Reduzierung des freigesetzten Stickstoffmonoxids. Bemerkenswert ist, dass das Freisetzungsmaximum durch das Thiol gegenüber der Blindprobe leicht erhöht ist. Ein Anstieg der Thiolkonzentration von $3.3 \cdot 10^{-2} \text{ M}$ auf $6.6 \cdot 10^{-2} \text{ M}$ hat eine Halbierung des detektierten NO zur Folge.

In zukünftig durchzuführenden Versuchen wird zu klären sein, ob die beobachteten Wechselwirkungen mit weiteren Thiolen bestätigt werden können und - im Hinblick auf Abb. 72 - welche Reaktionsprodukte in der Lösung nachgewiesen werden können.

2.8. Struktur-Freisetzungsbeziehungen von Diazeniumdiolaten

Die Zerfallshalbwertszeiten der NONOate können abhängig von der Struktur des NO-Donors stark variieren. Das Spektrum literaturbekannter Diazeniumdiolate umfasst Halbwertszeiten von wenigen Sekunden bis zu mehreren Tagen (Keefer, Nims, Davies, and Wink, 1996). Die NONOate werden je nach Dissoziationsgeschwindigkeit zu unterschiedlichen Zwecken eingesetzt. Für kurzfristig zu erzielende pharmakologische Effekte - wie einer raschen Blutdrucksenkung - werden bevorzugt kurzlebige Diazeniumdiolate verwendet (Diodati, Quyyumi, and Keefer, 1993). Bei langfristigen Untersuchungen - z.B. des Einflusses von NO auf die Proliferation kultivierter Gefäßmuskelzellen - ist die Anwendung langsam freisetzender NONOate sinnvoll (Mooradian, Hutsell, and Keefer, 1995).

Seit einiger Zeit werden zahlreiche Anstrengungen unternommen, den Einfluss unterschiedlicher Substituenten auf das Freisetzungsverhalten der $[N(O)NO]^-$ -Gruppe zu untersuchen (Keefer, Flippen-Anderson, George, Shanklin, Dunams, Christodoulou, Saavedra, Sagan, and Bohle, 2001). Durch die in dieser Arbeit beschriebenen Darstellung von Freisetzungskurven mittels LMRS und die Ableitung von Zerfallshalbwertszeiten der analysierten Diazeniumdiolate hat man die Möglichkeit, die synthetisierten NONOate hinsichtlich ihres Freisetzungsprofils zu bewerten, zu vergleichen und aus den gewonnenen Daten allgemeine Struktur-Freisetzungsbeziehungen zu entwickeln. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen werden in diesem Kapitel beschrieben.

2.8.1. Versuchsdurchführung

Die untersuchten NONOate sind in *Tab. 8* - angeordnet nach ihrem Grundgerüst - aufgelistet. Die Freisetzungsprofile und die davon abgeleiteten Zerfallshalbwertszeiten sind mit Hilfe von Durchflussszellen bei pH-Werten von 6.0, 7.4 und 8.0 bei 20°C und einer Fließgeschwindigkeit von 0.8 l/min bestimmt worden. Einige NO-Donoren sind zusätzlich bei Temperaturen von 37 und 60°C vermessen worden. Die daraus resultierenden Zerfallshalbwertszeiten können *Tab. 9* entnommen werden.

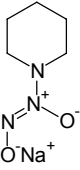
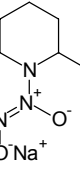
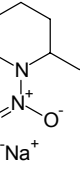
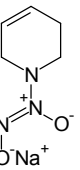
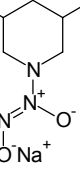
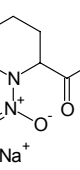
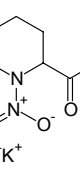
Um verschiedene Freisetzungsgeschwindigkeiten besser vergleichen zu können, wurde zusätzlich eine *relative Freisetzungskonstante* (r.F.) eingeführt. Die in *Tab. 8* in eckigen Klammern angegebene Konstante beschreibt die relative Dissoziationsgeschwindigkeit des NONOates bezogen auf die Leitstruktur **21a**. Dabei wird die bei pH 7.4 und 20°C ermittelte Geschwindigkeitskonstante dieser Verbindung willkürlich gleich eins gesetzt.

Bei der Auswertung der Versuche zeigt sich, dass die Freisetzungsprofile einiger sehr schnell freisetzender Diazeniumdiolate bei hohen Protonenkonzentrationen keine plausiblen Zerfallshalbwertszeiten liefern. Kapitel 2.6.2. informiert über die Grenzen der beschriebenen Methode. Danach limitieren Diffusions- und Transportzeit die Auswertung ultra-schneller Diazeniumdiolate. In *Tab. 8* wurden daher fehlende Halbwertszeiten durch Schätzwerte ergänzt. Die Schätzung der Geschwindigkeitsparameter ist durch Extrapolation des in Kapitel 2.7.1. vorgestellten $k/[H^+]$ -Plots möglich. Die extrapolierten Werte sind in der Tabelle kursiv dargestellt.

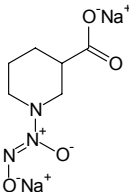
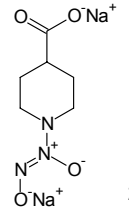
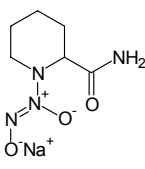
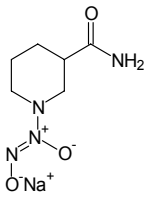
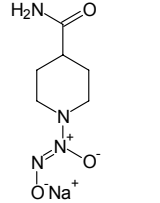
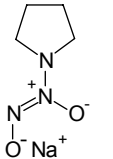
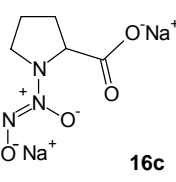
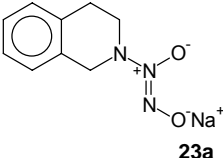
2.8.2. Ergebnis der pH-abhängigen Untersuchungen

Die aufgenommenen Freisetzungsprofile und die daraus abgeleiteten $k/[H^+]$ -Plots sind in *Abb. 74ff* dargestellt. Die ermittelten Zerfallshalbwertszeiten können *Tab. 8* entnommen werden.

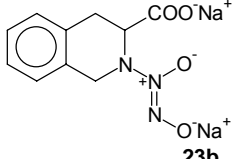
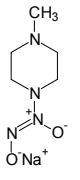
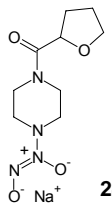
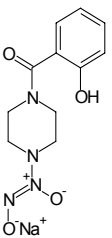
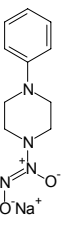
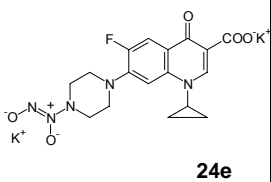
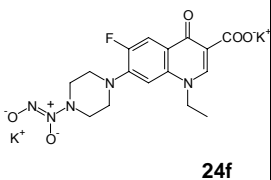
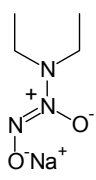
Tab. 8: Zerfallshalbwertszeiten der untersuchten NONOate abhängig von der Protonenkonzentration des Puffermediums. Verbindungen **13d**, **21e**, **21m-o** und **24d-f** wurden von Gamal Abu-Rahma synthetisiert, **24c** vom AK Duchstein zur Verfügung gestellt.

Diazeniumdiolate	$t_{1/2}$ bei pH 6.0 in Sekunden (Minuten) ± STABW [r.F. bezogen auf 21a]	$t_{1/2}$ bei pH 7.4 in Sekunden (Minuten) ± STABW [r.F. bezogen auf 21a]	$t_{1/2}$ bei pH 8.0 in Sekunden (Minuten) ± STABW [r.F. bezogen auf 21a]
 21a	8 ± 1 [15.6]	125 ± 10 (2.1) [1]	440 (7.3) [0.3]
 21b	50 ± 3 [2.5]	280 ± 3 (4.7) [0.4]	500 (8.3) [0.3]
 21c	40 ± 2 [3.1]	325 (5.4) [0.4]	k.A.
 21d	7 [17.9]	145 (2.5) [0.9]	540 (9) [0.2]
 21l	5 ± 1 [25]	85 ± 10 [1.5]	240 (4.0) [0.5]
 21g	1.54 [81]	30 ± 6 [4.0]	75 ± 5 [1.6]
 21h	1.24 [100.0]	30 [4.2]	75 [1.6]

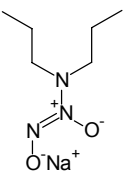
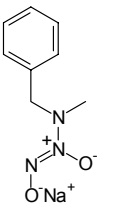
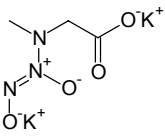
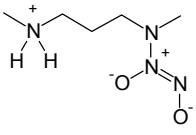
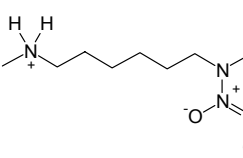
Fortsetzung Tab. 8

 <p>21i</p>	5 [25]	115 (1.9) [1.1]	255 (4.3) [0.5]
 <p>21k</p>	8 [15.6]	105 (1.8) [1.2]	330 (5.5) [0.4]
 <p>21m</p>	2.12 [59]	45 [2.9]	110 (1.9) [1.1]
 <p>21n</p>	17 [7.4]	300 (5) [0.4]	1030 (17.2) [0.1]
 <p>21o</p>	13 [9.6]	310 (5.2) [0.4]	875 (14.6) [0.1]
 <p>16a</p>	0.73 [170]	15 ± 3 [8.3]	40 [3.1]
 <p>16c</p>	0.68 [185]	13 ± 3 [9.6]	21 [6.0]
 <p>23a</p>	8 [15.6]	160 (2.7) [0.8]	890 (14.8) [0.1]

Fortsetzung Tab. 8

 <p>23b</p>	1.22 [102]	25 [4.8]	70 [1.7]
 <p>24a</p>	330 (5.5) [0.4]	1280 (21.3) [0.1]	1410 (24) [0.1]
 <p>24b</p>	95 [1.3]	1100 (18.3) [0.1]	1800 (30) [0.07]
 <p>24c</p>	83 [1.5]	1000 [0.1]	k.A.
 <p>24d</p>	47 [2.7]	630 (10.5) [0.2]	1270 (21.2) [0.1]
 <p>24e</p>	55 [2.3]	690 (11.5) [0.18]	1480 (24.7) [0.08]
 <p>24f</p>	50 [2.5]	700 (11.7) [0.18]	1230 (21) [0.1]
 <p>13a</p>	45 ± 2 [2.7]	460 ± 60 (7.7) [0.3]	k.A.

Fortsetzung Tab. 8

 <p>13b</p>	50 [2.7]	350 (5.8) [0.4]	k.A..
 <p>13c</p>	20 ± 4	370 ± 20 (6.2) [0.3]	1550 (25.8) [0.1]
 <p>13d</p>	0.88 [142]	20 [5.7]	85 [1.4]
 <p>17</p>	70 [1.8]	1150 (19.2) [0.1]	k.A.
 <p>22</p>	9 [13.9]	340 (5.6) [0.4]	610 (10.2) [0.2]

STABW = Standardabweichung; [r.F.] = relative Freisetzungskonstante bezogen auf Verbindung **21a** bei pH 7.4, 20°C, *kursiv* = durch Extrapolation des $k/[H^+]$ -Plots geschätzte Werte.

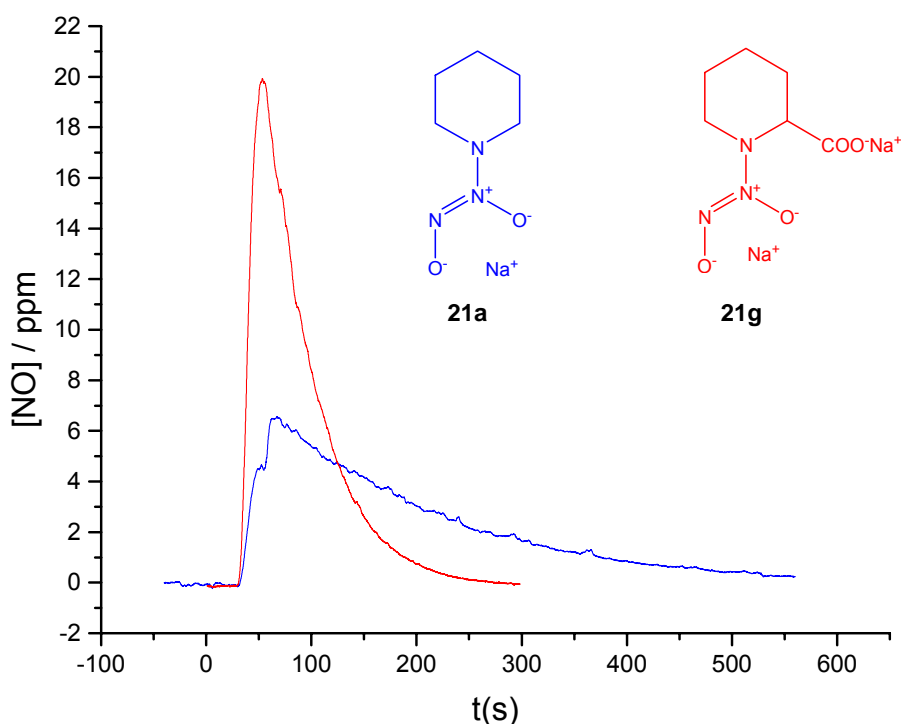


Abb. 74: Freisetzungssprofile von **21a** und **21g** bei pH 7.4 und 20°C. $t_{1/2}(\mathbf{21a})$: 125s; $t_{1/2}(\mathbf{21g})$: 30s.

Die Einführung einer Carboxylgruppe in α -Stellung zur [N(O)NO]-Gruppe am Piperidin führt gegenüber der unsubstituierten Verbindung zu einer Vervierfachung der NO-Freisetzungsgeschwindigkeit. In Abb. 74 werden die Freisetzungssprofile der Piperidinderivate **21a** ($t_{1/2}$: 125s) und **21g** ($t_{1/2}$: 30s) einander gegenübergestellt.

Die Art des Gegenions von Diazeniumdiolat- bzw. Carboxylanion ist für die Freisetzungsgeschwindigkeit unerheblich. Sowohl das Natriumsalz **21g** als auch das Kaliumsalz **21h** weisen Zerfallshalbwertszeiten von 30s bei pH 7.4 und 20°C auf.

Werden die Liberationsprofile aller untersuchten „2-Carboxy“-Diazeniumdiolate verglichen (Abb. 75), so stellt man fest, dass PROLI/NO (**16c**) ein deutlich höheres Freisetzungspotential besitzt als die anderen carboxylierten NO-Donoren. Auch für das offenkettige Sarcosinderivat **13d** zeigt der $k/[H^+]$ -Plot höhere Freisetzungskonstanten über den gesamten pH-Bereich. Erst mit deutlichem Abstand folgen dann die NO-Donoren **21g** und **23b** (Abb. 75).

Die Freisetzungskurven der 3- und 4-Piperidincarbonsäure (**21i** und **21k**) unterscheiden sich kaum von einander und zeigen ein ähnliches Profil wie die Liberationskurve der unsubstituierten Leitstruktur **21a**. Beide setzen deutlich langsamer NO frei als Verbindung **21g** (Abb. 76).

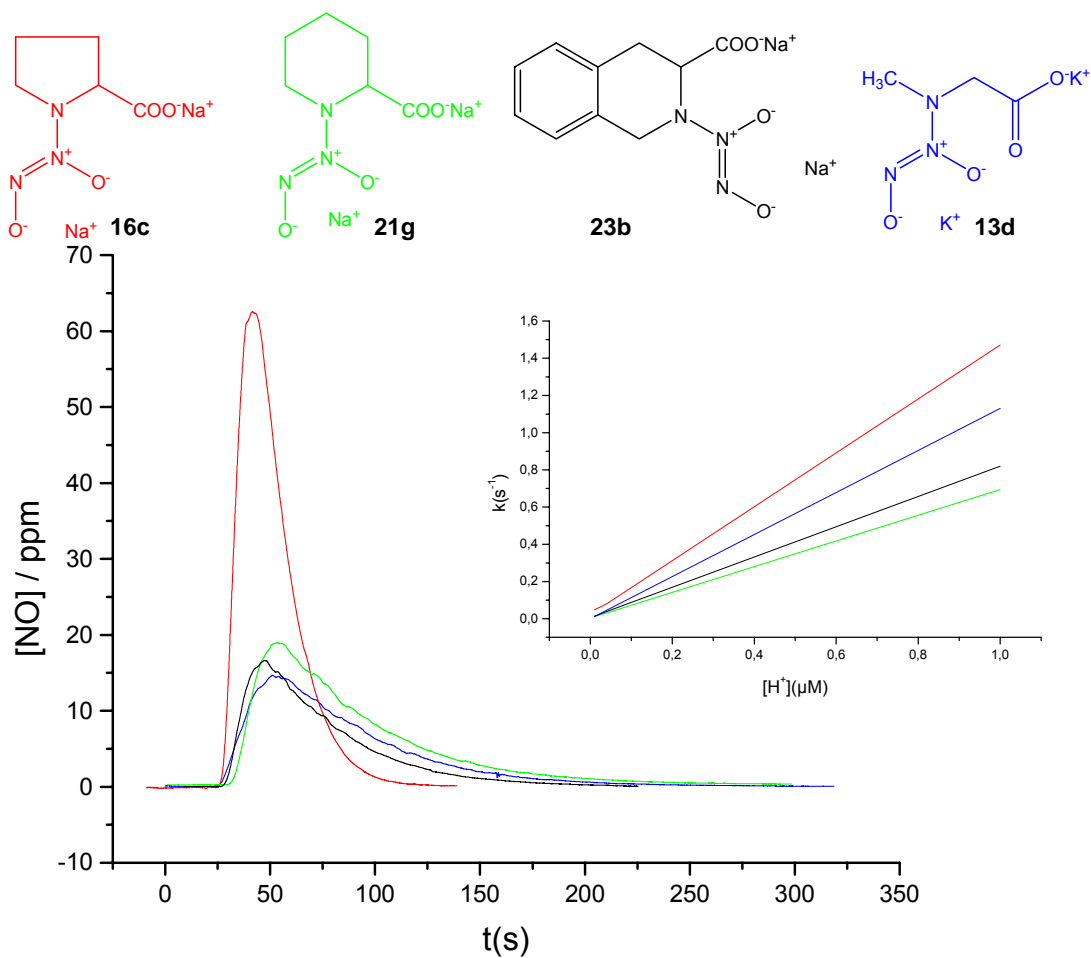


Abb. 75: Freisetzungprofile und $k/[H^+]$ -Plots von **16c**, **21g**, **23b** und **13d** bei pH 7.4 und 20°C. $t_{1/2}$ (**16c**): 13 s.; $t_{1/2}$ (**21g**): 30 s; $t_{1/2}$ (**23b**): 25 s; $t_{1/2}$ (**13d**): 20 s.

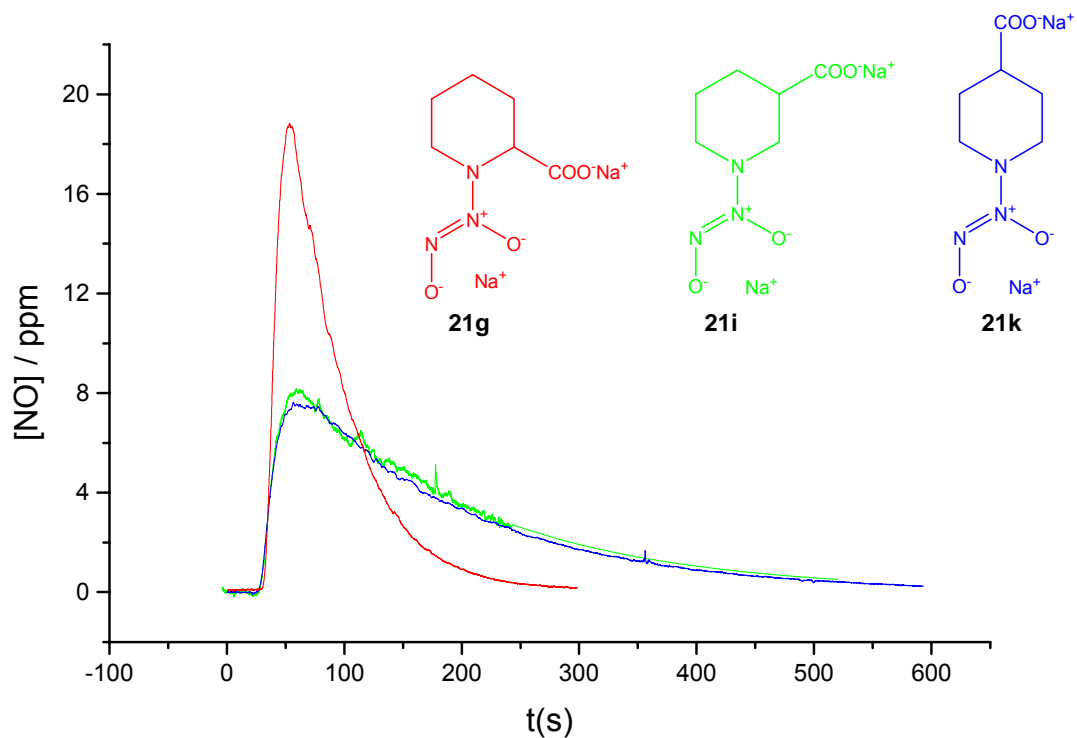


Abb. 76: Freisetzungprofile von **21g**, **21i** und **21k**. $t_{1/2}$ (**21g**): 30 s; $t_{1/2}$ (**21i**): 115 s; $t_{1/2}$ (**21k**): 105 s (pH 7.4; 20°C).

Die Carbonsäureamide des Piperidins setzen deutlich langsamer NO frei als die analogen Carbonsäuresalze. Allerdings zeigt auch hier das 2-substituierte **21m** mit einer Zerfallshalbwertszeit von 45 Sekunden (pH 7.4; 20°C) ein deutlich höheres Freisetzungspotential als **21n** (300s) und **21o** (310s). Insgesamt bleibt **21m** hinter den Piperidin-2-carbonsäuren **21g** (30s) und **21h** (30s) zurück. Bemerkenswert ist, dass die Einführung der CONH₂-Gruppe in die Positionen 3 oder 4 des Piperidinringes die Freisetzungsgeschwindigkeit gegenüber der unsubstituierten Leitstruktur **21a** (125s) sogar um den Faktor 2.5 verzögert. In Abb. 77 sind die Freisetzungprofile und $k/[H^+]$ -Plots der Carbonsäuren und Carbonsäureamide abgebildet.

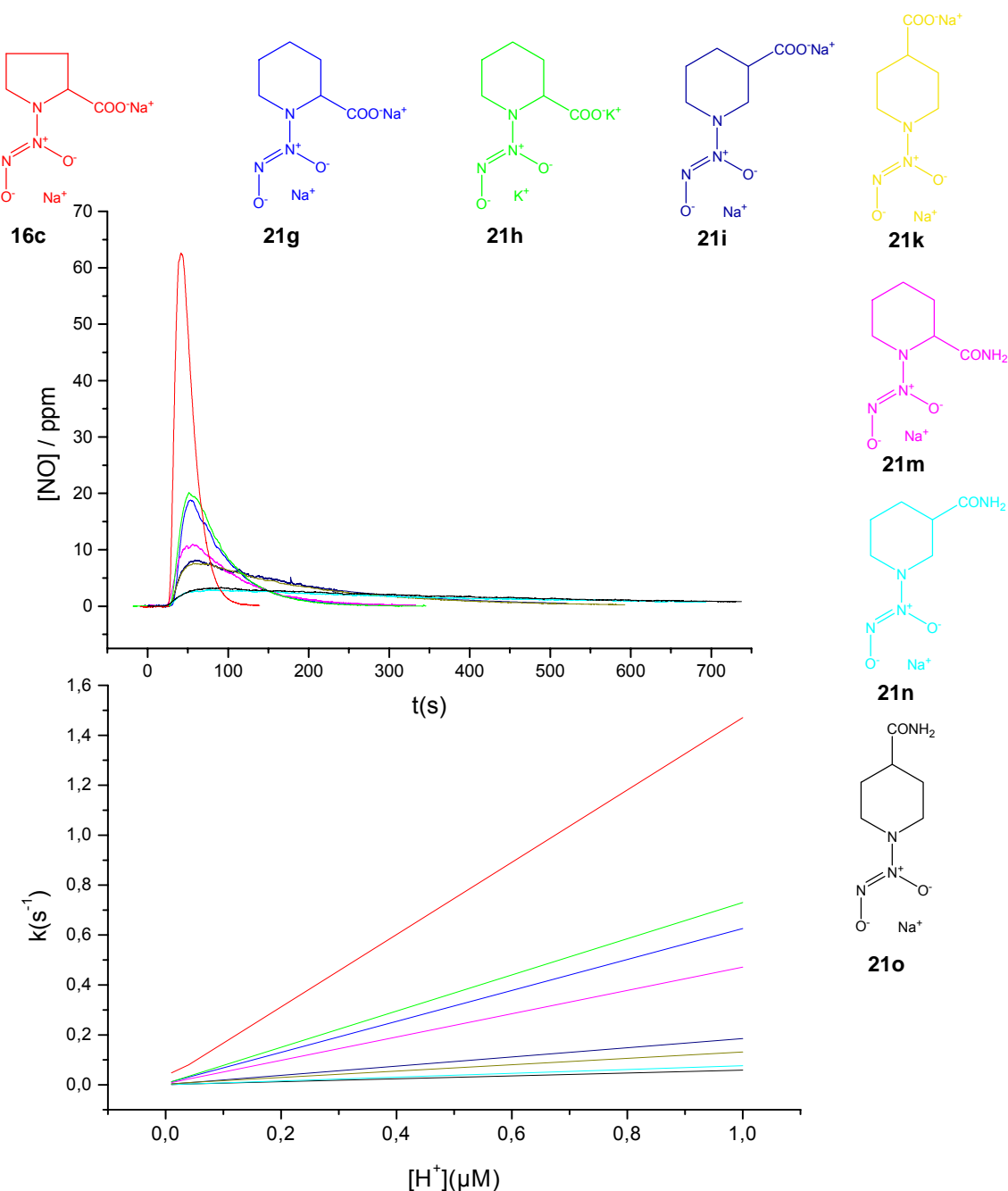


Abb. 77: Freisetzungprofile und $k/[H^+]$ -Plots der abgebildeten Verbindungen bei pH 7.4 und 20°C. $t_{1/2}$ (**21g**): 30 s; $t_{1/2}$ (**21h**): 30 s; $t_{1/2}$ (**21i**): 115 s; $t_{1/2}$ (**21k**): 105 s; $t_{1/2}$ (**21m**): 45 s; $t_{1/2}$ (**21n**): 300 s; $t_{1/2}$ (**21o**): 310 s; $t_{1/2}$ (**16c**): 13 s.

Eine α -Methylierung am Piperidinring des Diazeniumdiolats führt gegenüber der unsubstituierten Verbindung zu einer Verzögerung der Dissoziation. Eine Verlängerung der Alkyl- zur Ethylgruppe bewirkt dagegen nur eine geringfügige Veränderung der Zerfallshalbwertszeit (Abb. 78). Indes weist das 3-,5-Dimethylpiperidinderivat **21i** ($t_{1/2}$: 84 s bei pH 7.4; 20°C) überraschend eine deutlich höhere Freisetzungsgeschwindigkeit auf als das unsubstituierte Piperidin (siehe Abb. 79).

Eine Verkleinerung des Piperidinrings um ein Kohlenstoffatom führt ebenfalls zu einer Beschleunigung der Liberation. Das Pyrrolidinderivat **16a** zeigt mit einer Zerfallshalbwertszeit von 15 Sekunden (pH 7.4; 20°C) das höchste Freisetzungspotential dieser Gruppe. Es ist um den Faktor 8 schneller als **21a**. Damit wird es dem Prolinderivat PROLI/NO (**16c**) nahezu ebenbürtig.

Weitere strukturelle Veränderungen am Piperidinring wie die partielle Dehydrierung bei **21d** oder die Ankondensation eines Benzolringes in **23a** führt nur zu geringfügigen Veränderungen des Freisetzungsprofils der Diazeniumdiolate (Abb. 79).

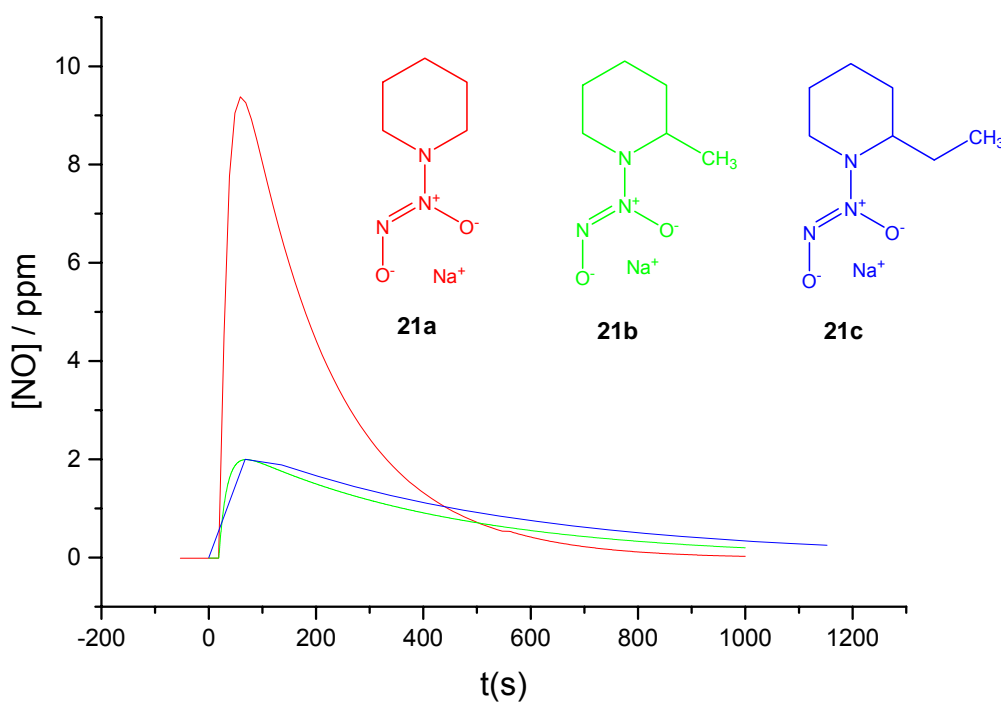


Abb. 78: Freisetzungskurven der Piperidinderivate **21a**, **21b** und **21c** bei pH 7.4 und 20°C. $t_{1/2}$ (**21a**): 125 s; $t_{1/2}$ (**21b**): 280 s; $t_{1/2}$ (**21c**): 325 s.

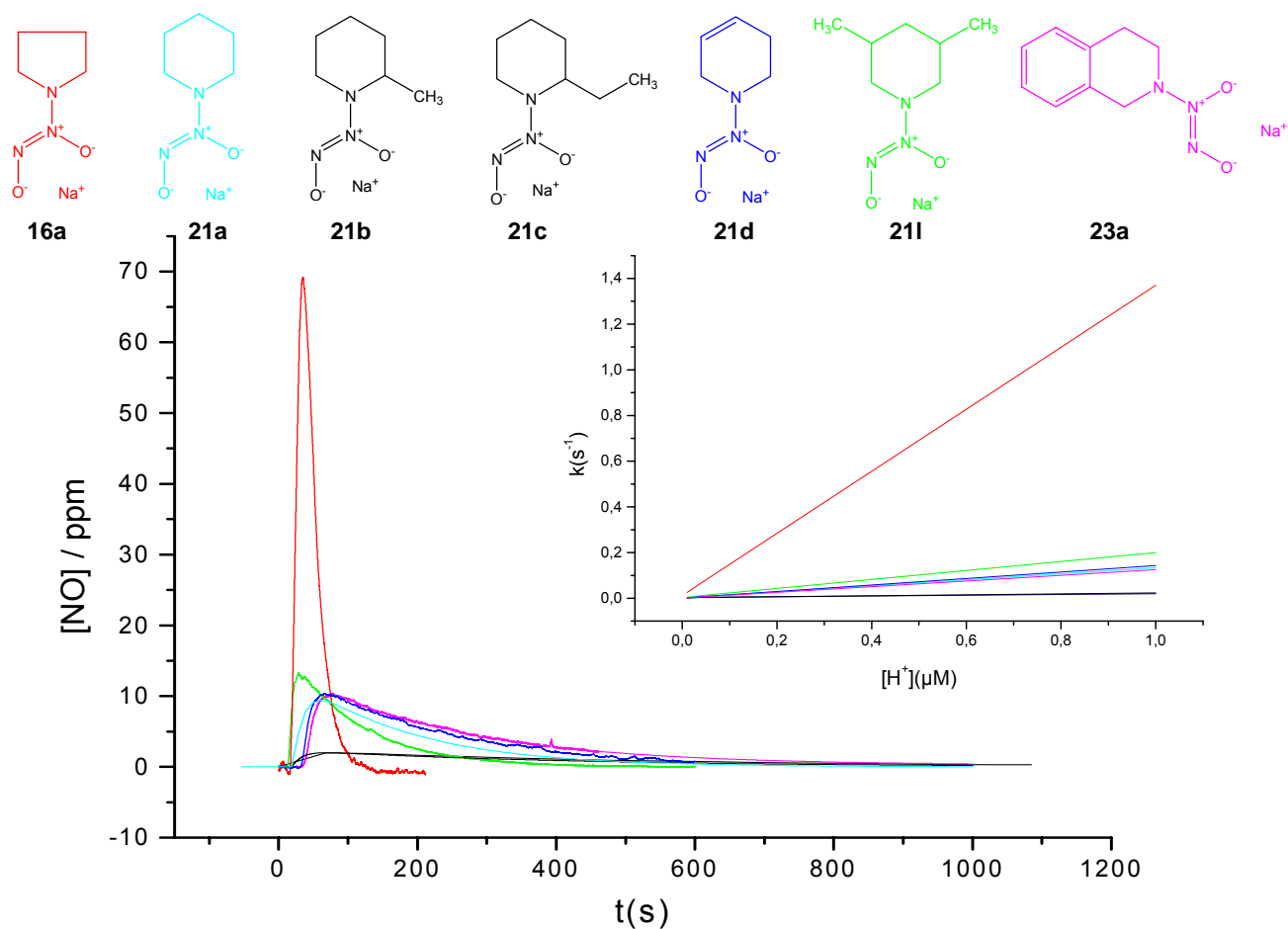


Abb. 79: Freisetzungskurven und $k/[\text{H}^+]$ -Plots der abgebildeten Verbindungen bei pH 7.4 und 20°C. $t_{1/2}(\mathbf{16a})$: 15 s; $t_{1/2}(\mathbf{21l})$: 85 s; $t_{1/2}(\mathbf{21a})$: 125 s; $t_{1/2}(\mathbf{21b})$: 280 s; $t_{1/2}(\mathbf{21c})$: 325 s; $t_{1/2}(\mathbf{21d})$: 145 s; $t_{1/2}(\mathbf{23a})$: 160 s.

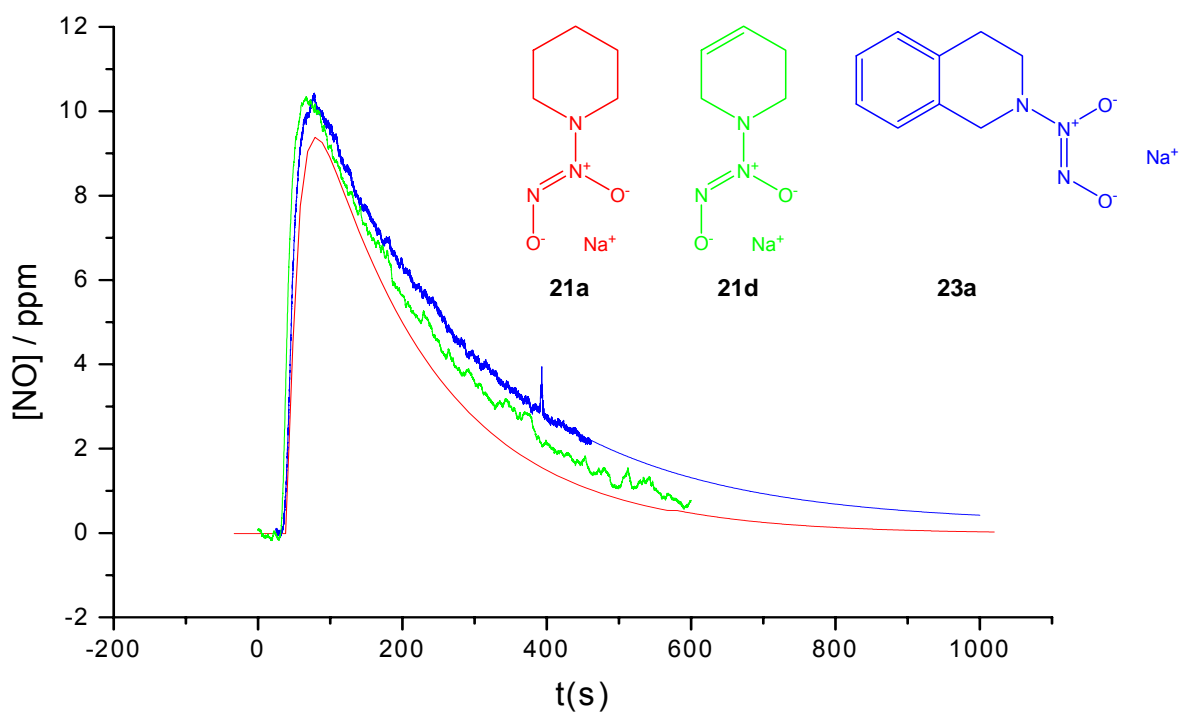
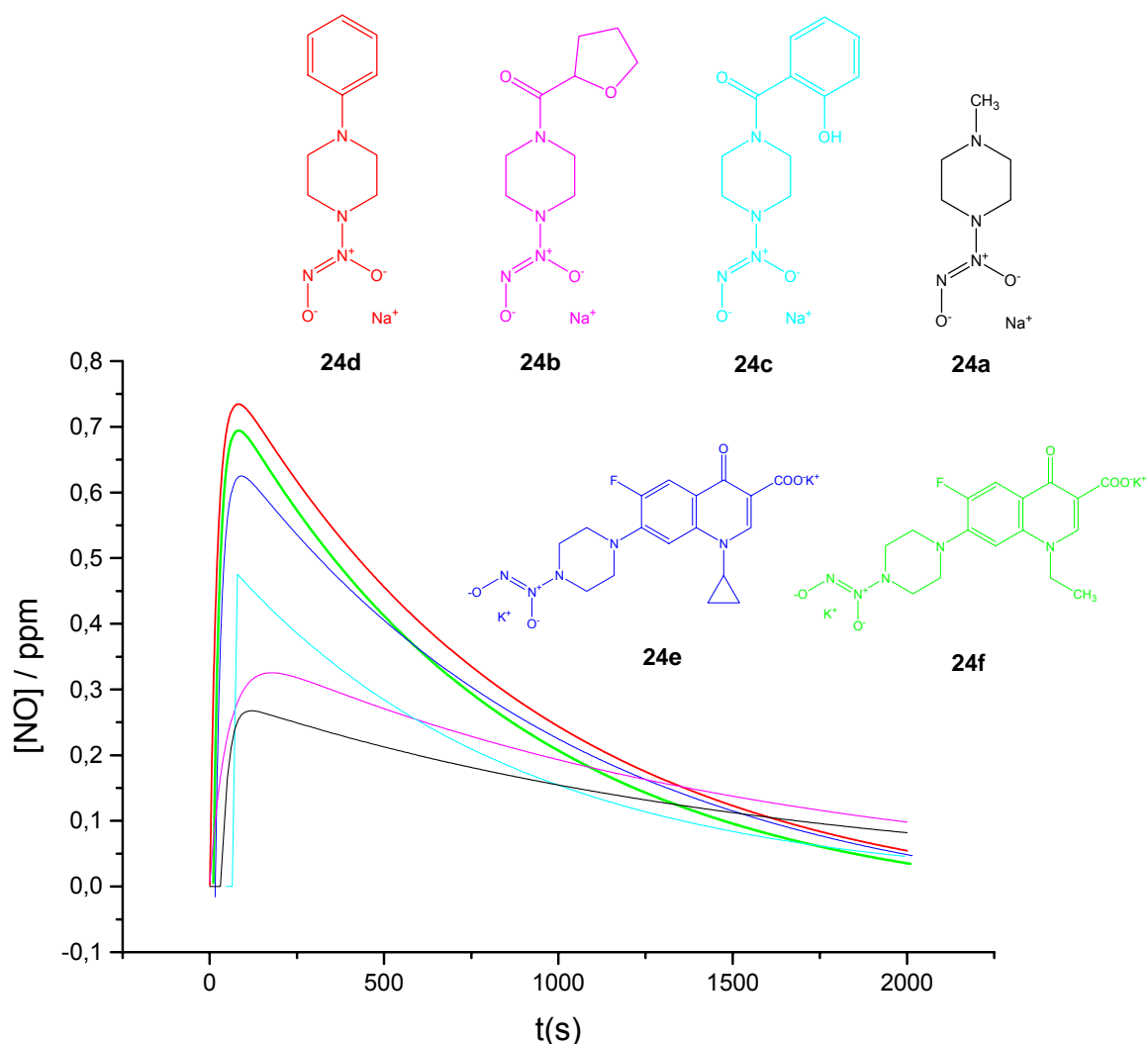


Abb. 80: Freisetzungskurven der abgebildeten Verbindungen bei pH 7.4 und 20°C. $t_{1/2}(\mathbf{21a})$: 125 s; $t_{1/2}(\mathbf{21d})$: 145 s; $t_{1/2}(\mathbf{23a})$: 160 s.

Die Diazeniumdiolate der Piperazinreihe setzen Stickstoffmonoxid deutlich langsamer frei als die untersuchten Pyrrolidin- und Piperidinderivate (*Abb. 81*). Das schnellste NONOat innerhalb dieser Gruppe ist das Phenylpiperazin (**24d**) mit einer Zerfallshalbwertszeit von 630 Sekunden. Das Derivat des N-Methylpiperazins (**24a**) dagegen ist mit einer Halbwertszeit von ca. 20 Minuten das Schlusslicht der untersuchten NONOate.

Komplexere Diazeniumdiolate der Piperazinreihe wie das Ciprofloxazin- (**24e**) und Norfloxazinderivat (**24f**) weisen mit Halbwertszeiten von 690 bzw. 700 Sekunden bei pH 7.4 und 20°C ein Freisetzungsprofil wie Phenylpiperazin (630 s) auf. Die Säureamide der Piperazinreihe **24b** und **24c** sind dagegen deutlich langsamer und zeigen einen ähnlichen Verlauf der Freisetzung wie Methylpiperazin. *Abb. 81* präsentiert die Freisetzungskurven der Piperazinreihe bei pH 7.4 und 20°C.



*Abb. 81: Freisetzungskurven der abgebildeten Verbindungen bei pH 7.4 und 20°C. $t_{1/2}$ (**24a**): 1280 s; $t_{1/2}$ (**24b**): 1100 s; $t_{1/2}$ (**24c**): 1000 s; $t_{1/2}$ (**24d**): 630 s; $t_{1/2}$ (**24e**): 690 s; $t_{1/2}$ (**24f**): 700 s.*

Die Dialkylaminderivate weisen untereinander nur geringe Unterschiede im Freisetzungsprofil auf. Mit Halbwertszeiten von 460 (**13a**), 350 (**13b**) bzw. 370 (**13c**) Sekunden bei pH 7.4 und 20°C liegen die offenkettigen Diazeniumdiolate mit ihrem Freisetzungsverhalten im Bereich der alkyltierten Piperidinderivate. Wie bei den zyklischen führt auch bei den offenkettigen NONOaten die Einführung einer Carboxylgruppe in α -Stellung der funktionellen Gruppe (**13d**) zu einer deutlichen Erhöhung der Liberationsgeschwindigkeit (siehe Abb. 75).

Anders als bei den Monoaminen kann bei den Zwitterionen der Diamine durch die Veränderung der Alkylreste das Freisetzungsprofil stark variieren. Durch Verlängerung des Alkyl-Spacers zwischen den Aminogruppen um drei Kohlenstoffatome wird in diesen Experimenten die Freisetzungsgeschwindigkeit vervierfacht (Abb. 83). Diese Beobachtung stimmt mit den Ergebnissen von *Hrabie et al.* zu den Struktur-Freisetzungsbeziehungen der zwitterionischen Diazeniumdiolate überein (Hrabie, Klose, Wink, and Keefer, 1993).

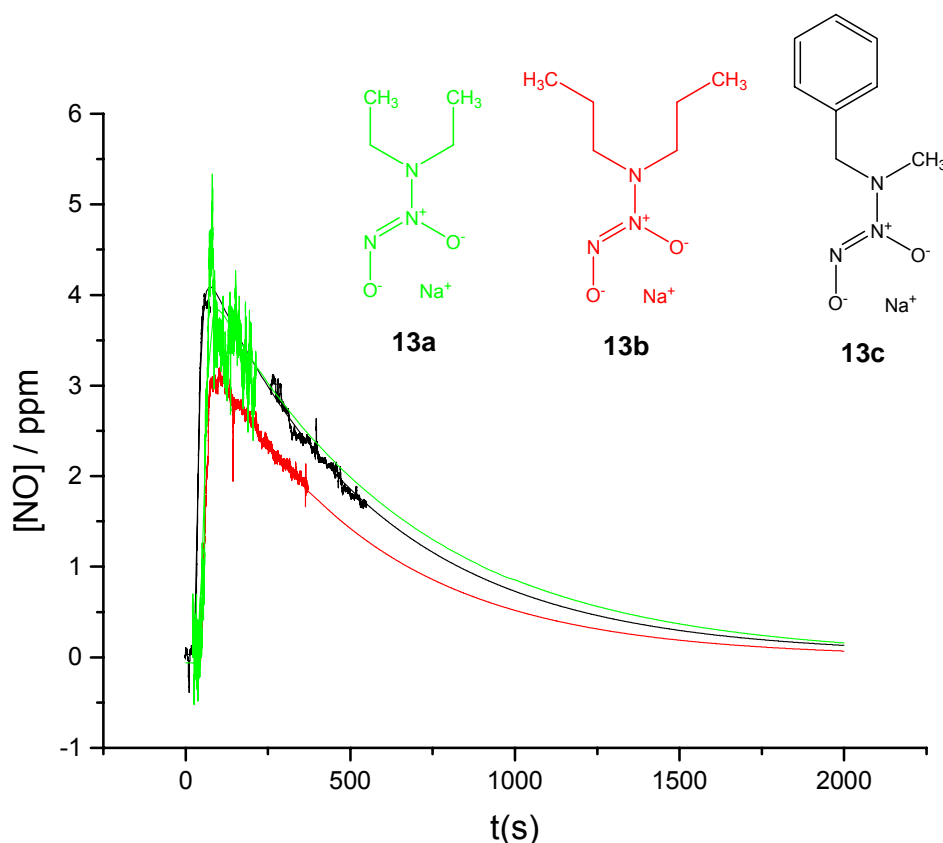


Abb. 82: Freisetzungsprofile der abgebildeten Verbindungen bei pH 7.4 und 20°C. $t_{1/2}$ (**13a**): 460 s; $t_{1/2}$ (**13b**): 350 s; $t_{1/2}$ (**13c**): 370 s.

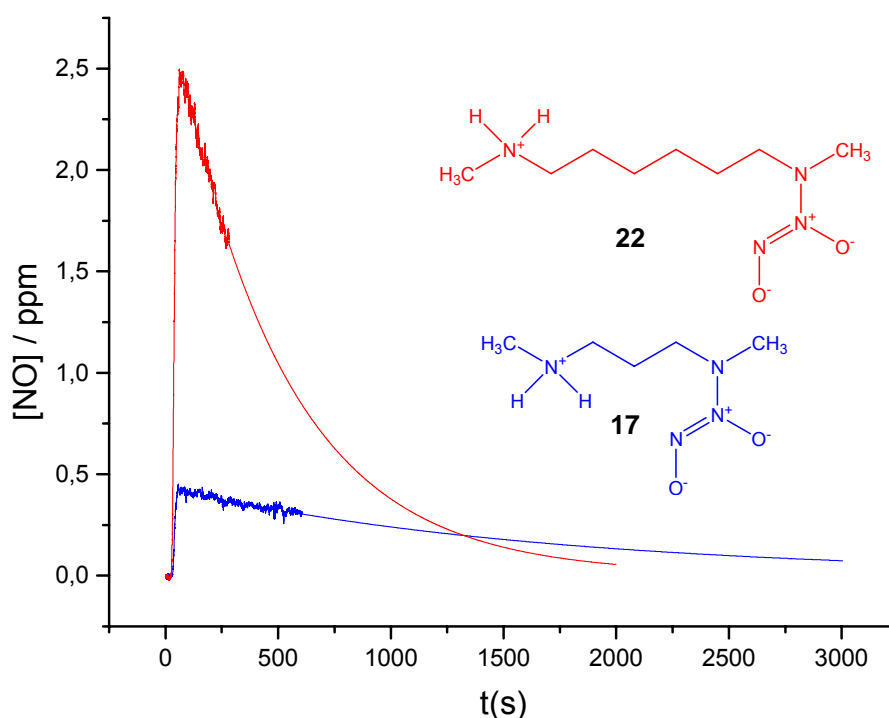


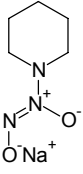
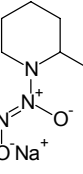
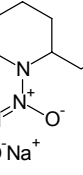
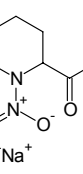
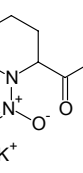
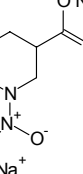
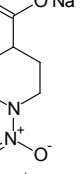
Abb. 83: Liberationsprofile von **17** und **22** bei pH 7.4 und 20°C. $t_{1/2}$ (**17**): 1150 s; $t_{1/2}$ (**22**): 340 s.

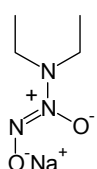
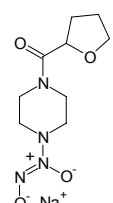
2.8.3. Ergebnisse der temperaturabhängigen Untersuchungen

Wie bereits in Kapitel 2.7.2 berichtet wurde, kann durch eine Erhöhung der Temperatur die Freisetzungsgeschwindigkeit eines NONOates enorm gesteigert werden. Die Leitstruktur **21a** zeigt bei physiologischen 37°C das Freisetzungsprofil eines ultra-schnellen NO-Donors. Auch die Derivate der Piperidin-3- und 4-carbonsäure, deren Profil sich vom Freisetzungsverlauf des unsubstituierten Piperidinderivates ohnehin kaum unterscheidet, vervielfachen wie **21a** ihre Freisetzungsgeschwindigkeit bei einer Temperaturerhöhung von 20 auf 37°C.

Dagegen kommt es bei den alkylierten Piperidinderivaten in diesem Bereich nur zu einer geringfügigen Erhöhung der Geschwindigkeit um den Faktor 1.5. Bemerkenswert ist, dass die Freisetzungsprofile von 2-Methyl- und 2-Ethylpiperidin bei einer Temperaturerhöhung ein nahezu identisches Profil aufweisen.

Tab. 9: Zerfallshalbwertszeiten der dargestellten Diazeniumdiolate ermittelt mit Hilfe der Durchflusszelle bei Puffertemperaturen von 20°C, 37°C und 60°C (pH 7.4).

Diazeniumdiolate	$t_{1/2}$ bei 20°C in Sekunden ± STABW [r.F. bezogen auf 21a]	$t_{1/2}$ bei 37°C in Sekunden ± STABW [r.F. bezogen auf 21a]	$t_{1/2}$ bei 60°C in Sekunden ± STABW [r.F. bezogen auf 21a]
 21a	125 ± 10 [1]	25 ± 1 [5]	7 ± 1 [18]
 21b	280 ± 3 [0.5]	200 [0.6]	55 [2]
 21c	325 [0.4]	210 [0.6]	45 [3]
 21g	30 ± 6 [4]	11 ± 6 [11]	6 ± 2 [20]
 21h	30 [4]	7 [18]	k.A.
 21i	115 [1.1]	25 [5]	8 [16]
 21k	105 [1.2]	25 [5]	10 [12.5]

 <p>13a</p>	460 ± 60 [0.3]	180 ± 50 [0.7]	60 ± 10 [2]
 <p>24b</p>	1100 [0.1]	460 [0.3]	k.A.

STABW: Standardabweichung; [r.F.]: relative Geschwindigkeitskonstante bezogen auf **21a** bei pH 7.4 und 20°C.

2.8.4. Diskussion

Aus den Ergebnissen der Freisetzungsversuche lassen sich Regeln und Gesetzmäßigkeiten ableiten, mit denen der Verlauf von Freisetzungskurven unbekannter anionischer Diazeniumdiolate in Grenzen vorhergesagt werden kann, wenn auch dafür eine Ausweitung der Zahl von Verbindungen und Versuchen wünschenswert wäre. Die nachfolgenden Ausführungen sollten daher in weiteren Versuchen vertieft werden.

Das Freisetzungsprofil der anionischen Diazeniumdiolate hängt zunächst vom Grundgerüst der jeweiligen Verbindung ab. NONOate des Pyrrolidins haben sich beispielsweise als besonders dissoziationsfreudig, Piperazinderivate hingegen dissoziationsträger erwiesen. Die zu erwartenden Zerfallshalbwertszeiten steigen nach diesen Ergebnissen in der folgenden Reihenfolge an.

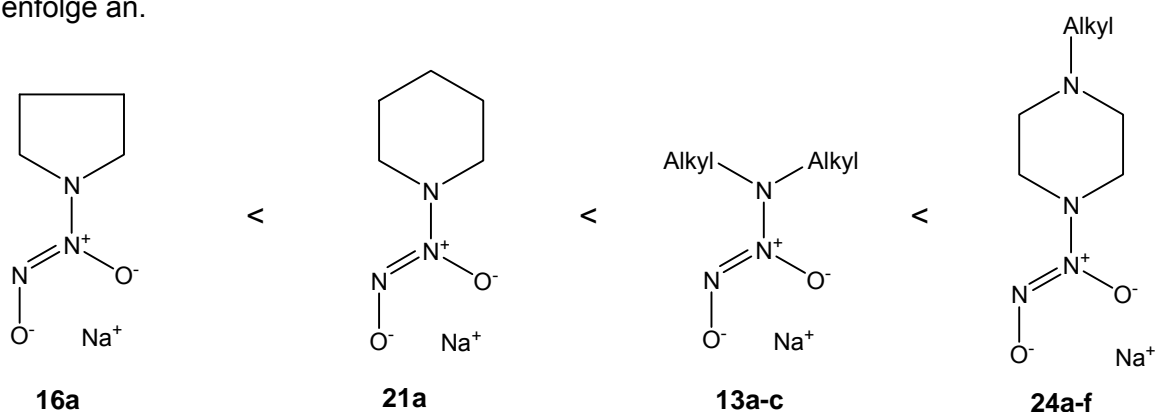


Abb. 84: Unsubstituierte Diazeniumdiolate angeordnet nach den ermittelten Zerfallshalbwertszeiten.

Die hohe Freisetzungsgeschwindigkeit beim Pyrrolidin hängt möglicherweise mit einer gegenüber Piperidin erhöhten Ringspannung zusammen, beim Piperazin ist ein zusätzlicher Puffereffekt des zweiten reaktiven Stickstoffs als Ursache für eine verzögerte NO-Freisetzung denkbar.

Ein weiterer Faktor, der die Dissoziationsgeschwindigkeit des NONOates nachhaltig beeinflusst, sind die Substituenten. Hier sind vor allem die Substituenten in der Nachbarschaft der funktionellen Gruppe zu nennen. Elektronenziehende funktionelle Reste (COO^- ; CONH_2) in α -Stellung beschleunigen, Alkylgruppen verzögern die NO-Freisetzung der $[\text{N}(\text{O})\text{NO}]^-$ -Gruppe. Die α -Substituenten können nach steigenden Zerfallshalbwertszeiten (diese gehen mit einem abnehmenden negativen induktiven Effekt bis hin zu einem +I-Effekt der Substituenten einher) wie folgt sortiert werden.

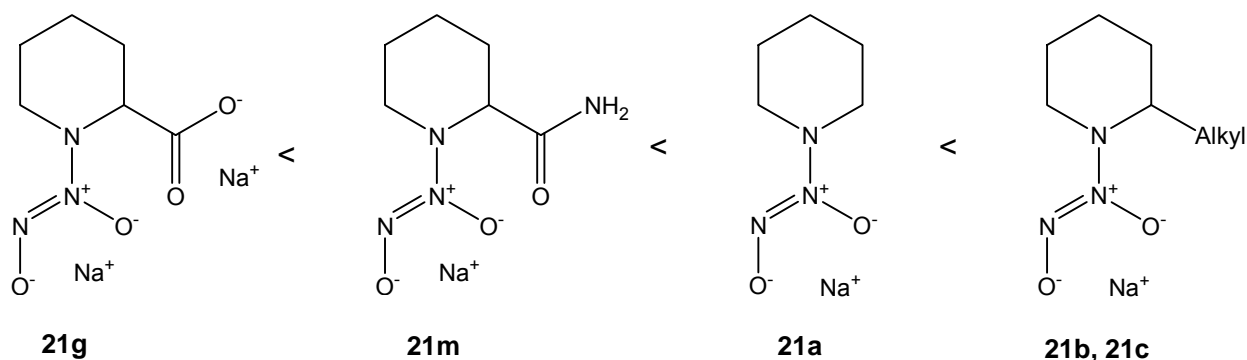


Abb. 85: Substituierte Diazeniumdiolate angeordnet nach den ermittelten Zerfallshalbwertszeiten.

Vergleicht man die elektronenziehenden Substituenten in α -Position, so weist das freie Carbonsäuresalz eine höhere Freisetzungsgeschwindigkeit auf als das Carbonsäureamid. Neben dem zuvor beschriebenen -I-Effekt scheint hier ein Nachbargruppeneffekt die NO-Freisetzung zu beschleunigen, der bei der Carboxylgruppe am stärksten ausgeprägt ist. An den Positionen 3 und 4 des Piperidinringes haben Carboxylgruppen dagegen keine, CONH_2 -Gruppen sogar einen verzögernden Einfluss auf das Freisetzungsverhalten des NONOates gegenüber der unsubstituierten Verbindung. Die Zerfallshalbwertszeiten steigen demnach in der Reihenfolge:

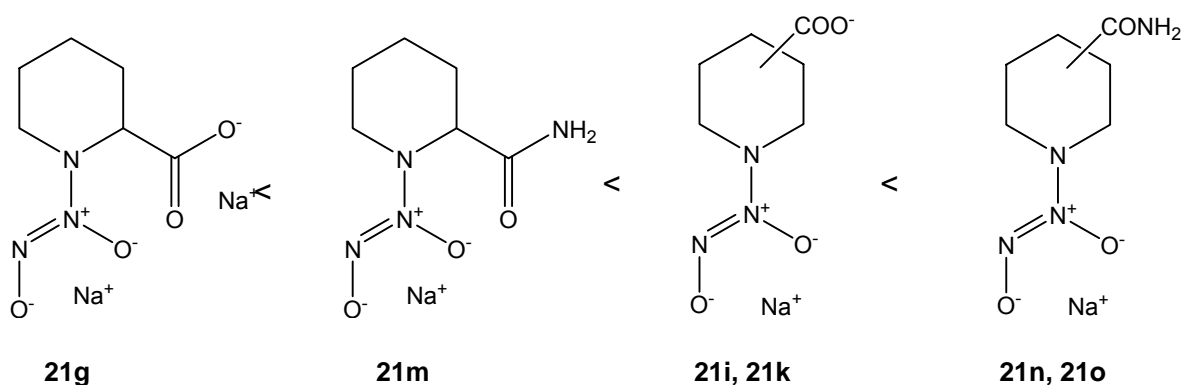


Abb. 86: Diazeniumdiolate angeordnet nach den ermittelten Zerfallshalbwertszeiten.

Carboxylgruppen in 3- und 4-Position des Piperidin-Diazeniumdiolats beeinflussen die NO-Liberation kaum, die Carboxylatgruppe in 2-Position steigert sie dramatisch. Der Grund für

diesen Nachbargruppeneffekt könnte in einer Destabilisierung der Diazeniumdiolatgruppe durch intramolekulare Chelatisierung, z.B. im Sinn der Struktur **21g** (Abb. 87) begründet sein.

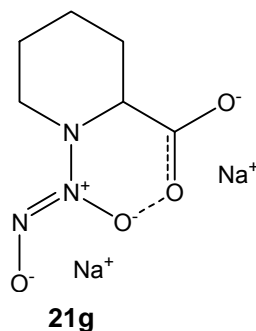


Abb. 87: Denkbare Chelatisierung von **21g**.

Die Freisetzungskurven der 3,4-Carbonsäurederivate zeigen ein ähnliches Profil wie das unsubstituierte Piperidinderivat (**21a**), die Dissoziationsgeschwindigkeiten der 3,4-Carbonsäureamide sind dagegen gegenüber **21a** und auch **21i** und **21k** erniedrigt. Eine Erklärung dafür könnten jedoch entgegengesetzte, unterschiedlich stark ausgeprägte Einflüsse der Substituenten sein. Während bei den Säureanionen die sterische Hinderung der Substituenten keine Rolle spielt, scheint bei den 3- und 4-Säureamiden der sterische den elektronischen Einfluss zu überwiegen, weshalb die Zerfallshalbwertszeiten erhöht sind.

Nicht zu erklären ist derzeit die hohe Dissoziationsgeschwindigkeit des 3,5-alkylierten Piperidinderivates.

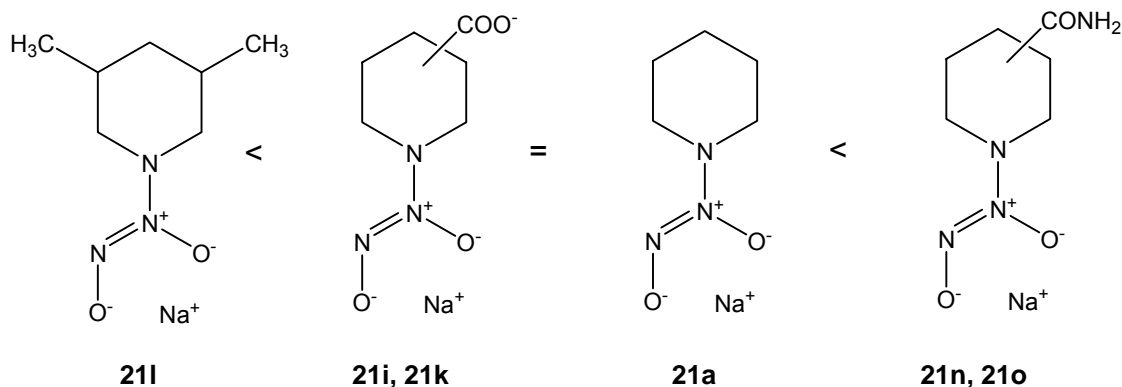


Abb. 88: Substituierte Diazeniumdiolate angeordnet nach den ermittelten Zerfallshalbwertszeiten.

Bei den Piperazinderivaten hängt die Freisetzungsgeschwindigkeit der NONOate offensichtlich vom Substituenten des zweiten reaktiven Stickstoffs ab. In diesen Versuchen konnte festgestellt werden, dass die Verknüpfung mit einem Aromaten die Dissoziationsgeschwindigkeit gegenüber einfachen N-Alkylpiperazinderivaten deutlich erhöht. Dabei scheint es nicht auf die Komplexizität der jeweiligen Verbindung anzukommen, denn Ciprofloxazin- und Norfloxazinderivate weisen Freisetzungprofile etwa wie das einfache Phenylpiperazin auf. Acylreste haben keinen oder nur einen sehr geringen Einfluss auf die Freisetzungsgeschwindigkeit der Piperazinderivate.

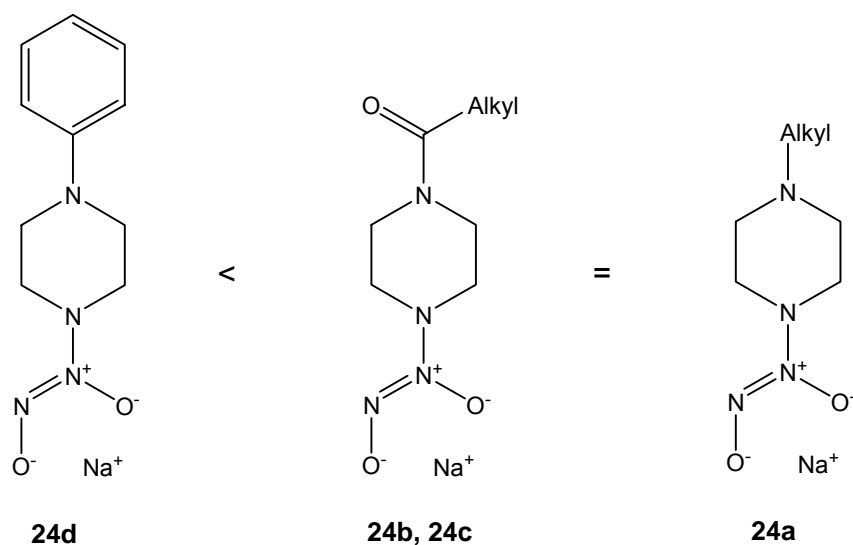


Abb. 89: Diazeniumdiolate des Piperazins angeordnet nach den ermittelten Zerfallshalbwertszeiten.

Die „offenkettigen“ Diazeniumdiolate stellen zwar eine heterogene Gruppe dar, weisen allerdings häufig ähnliche Freisetzungsprofile auf. Einzige Ausnahme ist das Sarcosinderivat, eine Bestätigung der Regel, dass die Einführung einer α -Carboxygruppe die NO-Freisetzung beschleunigt.

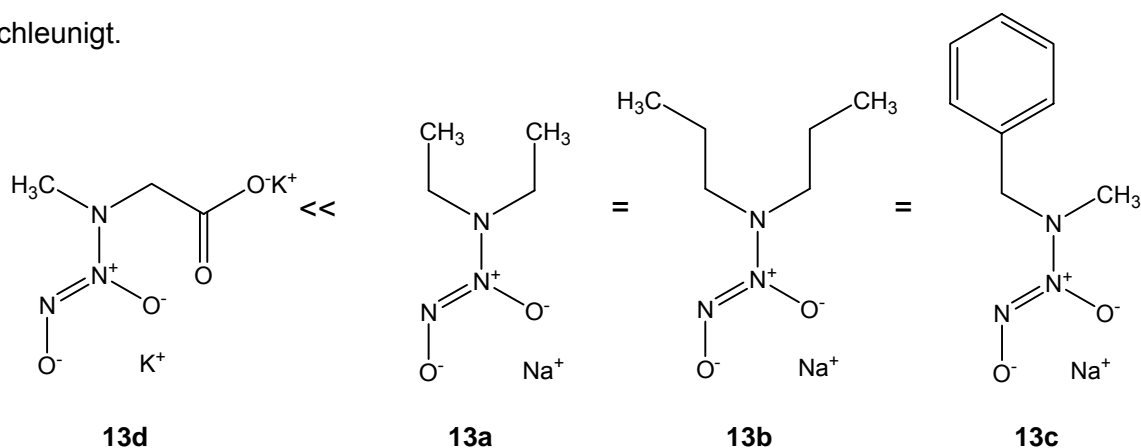
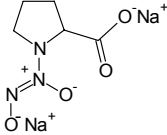
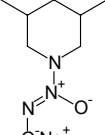
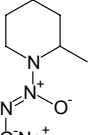
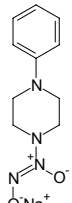
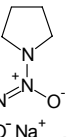
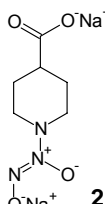
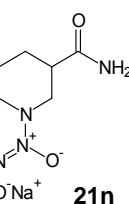
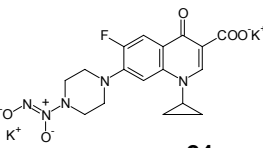
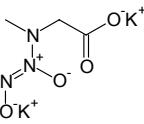
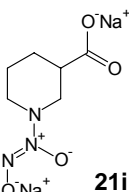
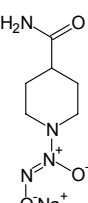
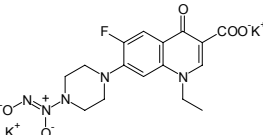
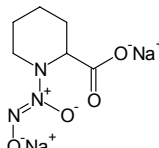
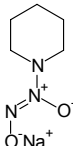
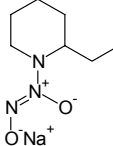
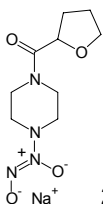
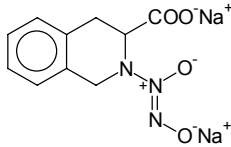
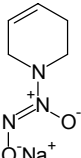
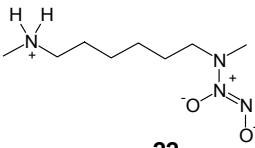
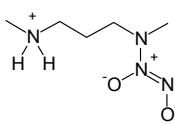
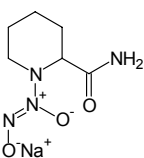
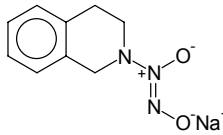
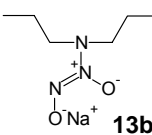
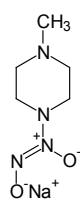
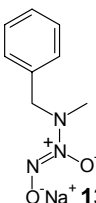
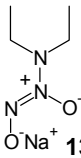


Abb. 90: Offenkettige Diazeniumdiolate angeordnet nach den ermittelten Zerfallshalbwertszeiten.

Tab. 10 verschafft abschließend einen Überblick über die vermessenen NONOate, die nach ihren Zerfallshalbwertszeiten in vier Gruppen eingeordnet wurden (links oben die schnellste, rechts unten die langsamste Verbindung).

Tab. 10: Überblick über die vermessenen Diazeniumdiolate, geordnet nach Halbwertszeiten der NO-Freisetzung in 4 Gruppen.

<60 s	60-160 s	160-460 s	>600 s
 <p>16c</p>	 <p>21l</p>	 <p>21b</p>	 <p>24d</p>
 <p>16a</p>	 <p>21k</p>	 <p>21n</p>	 <p>24e</p>
 <p>13d</p>	 <p>21i</p>	 <p>21o</p>	 <p>24f</p>
 <p>21g</p>	 <p>21a</p>	 <p>21c</p>	 <p>24b</p>
 <p>23b</p>	 <p>21d</p>	 <p>22</p>	 <p>17</p>
 <p>21m</p>	 <p>23a</p>	 <p>13b</p>	 <p>24a</p>
		 <p>13c</p>	
		 <p>13a</p>	

C Pharmakologischer Teil

1. Freisetzung von NO aus Diazeniumdiolaten in Tierblut

Die vorangegangenen Kapitel beschäftigen sich mit der *in wässriger Lösung* durchgeführten Bestimmung der NO-Freisetzung aus anionischen Diazeniumdiolaten. Die Experimente wurden überwiegend bei pH 7.4 und 37°C durchgeführt, um dem physiologischen Freisetzungsverhalten der NO-Donoren nahe zu kommen. Mit den erhaltenen Versuchsergebnissen können dennoch nur bedingt Aussagen über das Schicksal von NO *in der Blutbahn* getroffen werden, da die Zusammensetzung des Blutes (zelluläre Bestandteile und Blutplasma) im Experiment unberücksichtigt bleibt. Als Konsequenz sollen weitere Liberationsversuche zunächst in *Tierblut* und anschließend in herkömmlichen Puffermedien durchgeführt und verglichen werden.

Zwei Fragen stehen dabei im Mittelpunkt. Erstens: Verändert sich die Freisetzungskinetik der Diazeniumdiolate, wenn die Liberation statt in wässrigem Medium in Tierblut (bei ansonsten unveränderten Versuchsbedingungen) erfolgt? Zweitens: Welcher Anteil des liberierten NO wird aus Tierblut spontan in den Gasraum freigesetzt, welcher Anteil geht durch die Reaktion des NO mit Komponenten des Bluts verloren?

1.1. Vorbereitung der Versuche

Für die Durchführung der Freisetzungsversuche wurde die in *Abb. 42* dargestellte Versuchsanordnung mit Durchflusszelle und LMR-Spektrometer verwendet. Ergänzt wurde der Aufbau durch ein thermostatisiertes Wasserbad, das die Temperatur der Lösungen auf konstant 37°C hielt. Durch Zelle und Apparatur wurde synthetische Luft mit einer konstanten Fließgeschwindigkeit von 0.8 l/min geleitet.

Die Experimente wurden mit dem Piperazinderivat **24b** durchgeführt, das in wässriger Pufferlösung bei pH 7.4, 37°C und 0.8 l/min Fließgeschwindigkeit eine Zerfallshalbwertszeit von ca. 460 Sekunden aufweist. Dieser langsame *NO-releaser* wurde ausgewählt, da hier nach der Zugabe, aber lange vor Erreichen des Dissoziationsmaximums eine vollständige Verteilung des NO-Donors im gesamten Medium eintritt. Dies gewährleistet eine kontinuierliche NO-Abgabe an das gesamte Blutvolumen: eine wichtige Voraussetzung für die Untersuchung von potentiellen Stoffwechselvorgängen des Stickstoffmonoxids. Freigesetztes NO wird auf diese Weise im Blut gebunden bzw. umgesetzt oder gelangt in den Gasraum, wo es in der Messzelle detektiert wird.

Das benötigte Tierblut wurde beim örtlichen Schlachthof beschafft und gleich nach Erhalt mit ACD (Aqua Citrat Dextrose-Stabilisatorlösung) nach einer Arzneibuchmonographie für Blutkonserven stabilisiert. Nicht benötigtes Blut wurde nach einer Woche verworfen.

Zunächst wurden Freisetzungsversuche in den Tierblutproben durchgeführt, dann bei gleichen Bedingungen die Liberationsversuche im Puffermedium. Stamm- und Probenlösungen (Stammlösung $0.01 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$; Probenlösung $0.625 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) wurden an jedem Versuchstag durch Lösen in 0.01 M NaOH -Lösung hergestellt (siehe Kapitel 2.5).

1.2. *NO-Freisetzung in stabilisiertem Tierblut*

10 ml des stabilisierten Schweinebluts wurden in die Durchflusszelle gefüllt, im Wasserbad auf 37°C erwärmt, die Zelle mit dem Septum verschlossen und ein Gasfluss synthetischer Luft von 0.8 l/min durch Zelle und Apparatur eingestellt. Dies führte bei Blut zur Bildung von Schaum (Plasmaproteine), der trotz des Tropfenfängers in die *downstream* angeordnete Messzelle zu gelangen drohte. Es musste daher eine Methode gefunden werden, die Schaumbildung zu reduzieren.

Yang *et al.* schlagen vor, die Plasmaproteine durch aufwendiges Vorbehandeln des Blutes mit Zinksulfat zu denaturieren (Yang *et al.*, 1997). Durch Zugabe des oberflächenaktiven Substanzgemisches Dimethicon und Siliziumdioxid (*Simethicon*) gelang es sehr viel einfacher die Schaumbildung zu mindern. Wenige Tropfen einer simethiconhaltigen Fertigsuspension (*Sab Simplex*[®]), vor Beginn der Versuche der Blutlösung zugesetzt reichten dazu aus. Dabei wurde festgestellt, dass die beobachtete Freisetzungsgeschwindigkeit der eingesetzten Diazeniumdiolate durch den Zusatz Simethicons erhöht und die beobachtete Zerfallshalbwertszeit entsprechend verringert wird. Um Blut- und Pufferkurven dennoch miteinander vergleichen zu können, wurde *allen* Ansätzen vor Beginn 2 ml *Sab Simplex*[®] hinzugefügt.

In die so präparierte Blutlösung wurden $600.0 \text{ } \mu\text{l}$ (375 nmol) Probenlösung pipettiert, die Freisetzungskurve aufgezeichnet und die Zerfallshalbwertszeit berechnet. Durch Integration der Messkurve wurde die freigesetzte NO-Stoffmenge bestimmt. In *Abb. 91* links sind Beispiele der aufgezeichneten Liberationskurven dargestellt.

1.3. *NO-Freisetzung in wässrigen Pufferlösungen*

10 ml Phosphatpuffer (pH 7.4) wurden mit 2 ml *Sab Simplex*[®] versehen und in der Durchflusszelle auf 37°C erwärmt. Nach der Zugabe von $600.0 \text{ } \mu\text{l}$ (375 nmol) Probenlösung begann die Aufzeichnung der Freisetzungskurve (Beispiel siehe *Abb. 91 rechts*).

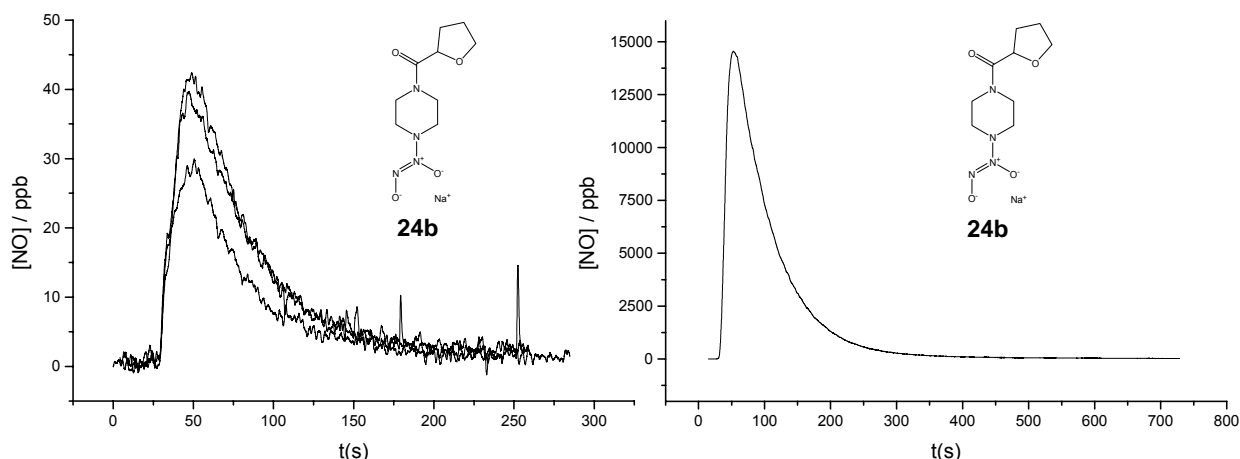


Abb. 91: NO-Freisetzungscurven von **24b**. Links: in Schweineblut (plus Sab Simplex[®], 37°C, 0.8 l/min), gemittelte Halbwertszeiten $t_{1/2}$: 25 ± 5 s, NO-Mengen $n(\text{NO})$: 1.5 ± 0.5 nmol (0.2% des maximal Möglichen). Rechts: in wässrigem Puffer (plus Sab Simplex[®], pH 7.4, 37°C, 0.8 l/min). $t_{1/2}$: 40 s; $n(\text{NO})$: 685 nmol (91%).

1.4. Ergebnisse

Die Auswertung der Freisetzungskurven in Abb. 91 ergibt für **24b** eine Zerfallshalbwertszeit von 40 s (ohne Sab Simplex[®] Zusatz 460 s) im Puffermedium (bei pH 7.4; 37°C; 0.8 l/min; mit Sab Simplex[®] Zusatz) und 25 ± 5 s in der Blutlösung (37°C; 0.8 l/min; mit Sab Simplex[®] Zusatz). Das bedeutet gegenüber dem Pufferwert eine signifikante Steigerung um den Faktor 1.6, für die zurzeit keine fundierte Erklärung abgegeben werden kann.

Bemerkenswert sind die Ergebnisse der quantitativen Auswertung. Während aus dem Puffermedium noch eine absolute Stoffmenge von 685 nmol NO (91.3% des maximal Möglichen) nachgewiesen werden kann, gelangen bei der Blutmessung lediglich 1.5 nmol NO vom Blut in den Gasraum (0.2%). Der weit überwiegende Anteil verbleibt also im Blut und wird allem Anschein nach gebunden oder verstoffwechselt. Abb. 92 verdeutlicht den großen Unterschied in der NO-Ausbeute bei Blut- und Puffermessung.

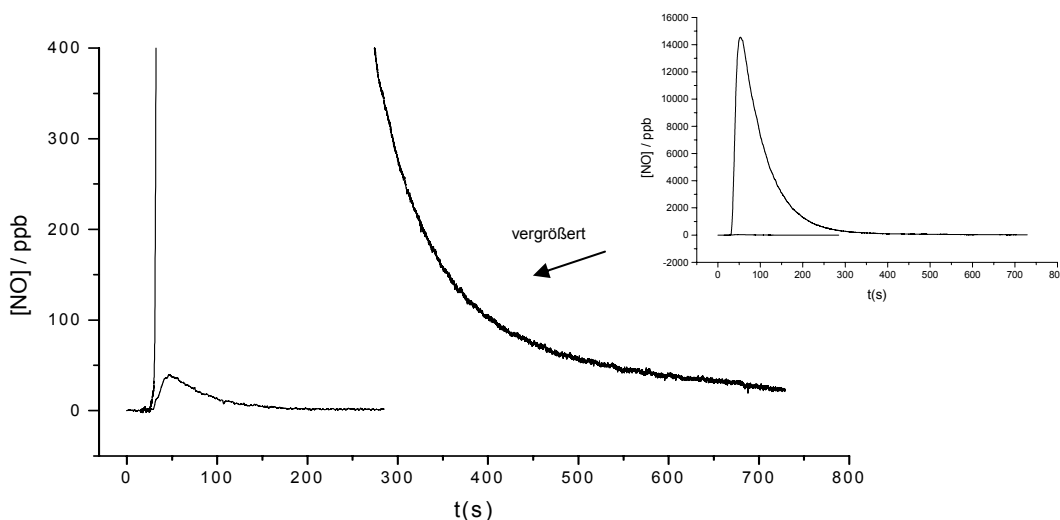


Abb. 92: Freisetzungskurven aus Abb. 91 in Schweineblut (h: 50 ppb) und wässrigem Puffer (h: 15000 ppb):

2. Bestimmung der Stoffwechselprodukte des NO

Die Untersuchung der Freisetzungskinetik von Diazeniumdiolaten in Tierblut hat gezeigt, dass der überwiegende Teil des freigesetzten NO im Blut verbleibt. Es ist anzunehmen, dass es durch Reaktion mit Bestandteilen des Blutes gebunden bzw. metabolisiert wird. Die wichtigsten stabilen Stoffwechselprodukte des NO im menschlichen Gewebe sind Nitrit und Nitrat (Ishibashi et al., 2003). Wechselwirkungen von freigesetztem NO mit Biomolekülen bringen weitere Reaktionsprodukte hervor (Jourd'heuil et al., 2000). So sind hier vor allem S-Nitrosothiole (S-nitrosierte Proteine) und NO-Hämoglobin-Komplexe (HbNO-Komplexe) zu nennen. Schließlich ist noch hinzuzufügen, dass freigesetztes NO auch die Eigenschaften des Bluts, z.B. durch sGC-gesteuerte Inhibition der Plättchenaggregation verändert.

Ziel der folgenden Versuche war es, das Schicksal des freigesetzten Stickstoffmonoxids in Tierblut zu untersuchen. Dazu müssen Methoden verfügbar sein, die wichtigsten NO-Metaboliten selektiv aus der Blutlösung zu bestimmen. Da mit der LMRS eine sehr empfindliche NO-Nachweismethode zur Verfügung steht, ist es nahe liegend, den Nachweis der Stoffwechselprodukte indirekt durch die chemoselektive Umsetzung der Metaboliten zu NO und Messung des Stickstoffmonoxids in der Gasphase durchzuführen. Durch diese erneute Freisetzung von NO aus den Metaboliten durch Zusatz selektiver Reduktionsmittel konnte man im Verlauf der Experimente Nitrit, Nitrat, S-Nitrosothiole und HbNO-Komplexe bestimmen. Nachfolgend werden zunächst die literaturbekannten Stoffwechselprozesse des NO zusammengefasst. Anschließend geht das Kapitel auf die Durchführung und Ergebnisse der Untersuchungen ein.

2.1. Der NO-Stoffwechsel

Das Schicksal des NO, das aus L-Arginin im Gewebe gebildet wird, ist von vielen Faktoren abhängig. Zell- bzw. Gewebetyp, Radikalfängerkonzentration, Art des Angriffziels und Entfernung vom Erfolgsprotein sind Beispiele für physiologische Größen, die den NO Stoffwechsel beeinflussen können (Miranda et al., 2003). Stickstoffmonoxid reagiert bevorzugt mit Proteinen (wobei Hämproteine eine besondere Rolle spielen) oder Radikalen (Wink and Mitchell, 1998). Vor allem die direkte Reaktion von NO mit einem Erfolgsprotein ist für den größten Teil der dem Stickstoffmonoxid zugeschriebenen physiologischen Prozesse (siehe *Einleitung*) verantwortlich. Eine Reihe von weiteren biochemischen Vorgängen ist nach jüngsten Erkenntnissen allerdings auf die Umformung von NO zu *reactive nitrogen oxide species* (RNOS) zurückzuführen. Wie Abb. 95 zeigt, entstehen die RNOS vor allem durch die Reaktion mit Sauerstoff (O_2) und dem Superoxidanion ($O_2^{\cdot-}$). RNOS sind Distickstofftrioxid (N_2O_3), Stickstoffdioxid (NO_2) und Peroxynitrit ($ONOO^{\cdot-}$) (Miranda, Nims, Thomas, Espey, Citrin, Bartberger, Paolocci, Fukuto, Feelisch, and Wink, 2003). Die RNOS

sind metastabil und führen zu Nitrosierungs-, Nitrierungs- und Redoxreaktionen. Ihre stabilen Stoffwechselendprodukte sind S-Nitrosothiole, Nitrit und Nitrat.

2.1.1. Bildung des Nitrosylkations

Die reaktiven RNOS sind für viele pathophysiologische Prozesse des NO-Stoffwechsels verantwortlich, z.B. als Ursache bestimmter Krebserkrankungen (Wink et al., 1998). Daneben wird ihnen aber auch die Rolle von physiologischen Botenstoffen zugeschrieben (Espey et al., 2000). Das bei der Zersetzung von N_2O_3 zu Nitrit entstehende Nitrosylkation (NO^+) (Abb. 93) ist beispielsweise verantwortlich für die Bildung von S-Nitrosothiolen (siehe Abb. 95) (Cook et al.,), denen eine wichtige Rolle bei Transport, Speicherung und Metabolismus des NO zu Teil wird (Jourdain, Hallen, Feelisch, and Grisham, 2000).

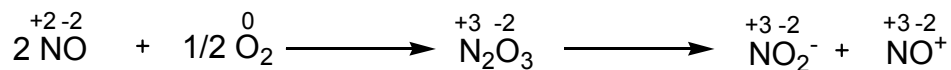


Abb. 93: Bildung des Nitrosylkations aus Distickstofftrioxid.

Die nitrosierenden Eigenschaften von N_2O_3 , z.B. für Thiole, Amine und reaktive Aromaten (McMahon et al., 2000), und die oxidierenden und nitrierenden Eigenschaften von Peroxynitrit, z.B. bei der Oxidation des Hämeisens (Umwandlung von Hb zu MetHb) oder Nitrierung von Tyrosinresten des Hämoglobins (Alayash et al., 1998), werden in Abb. 95 schematisch zusammengefasst.

2.1.2. Bildung des Nitroxylanions

Ein weiteres RNOS, das Nitroxylanion (NO^-), wird durch den Zerfall von Nitrosothiolen, aber unter bestimmten Bedingungen auch direkt durch NO-Synthasen gebildet (Adak et al., 2000). Unterschiedliche, zum Teil gegenläufige pharmakologische Effekte von NO und NO^- wurden beispielsweise bei Untersuchungen zur Inotropie und Vasomotorik am Tierherzen entdeckt (Ma et al., 1999). Ein bekannter NO^- -Donor ist *Angeli's salt*, $\text{Na}_2\text{N}_2\text{O}_3$, das in saurer Lösung wie folgt disproportioniert (Abb. 94) (Maragos, Morley, Wink, Dunams, Saavedra, Hoffman, Bove, Isaac, Hrabie, and Keefer, 1991):

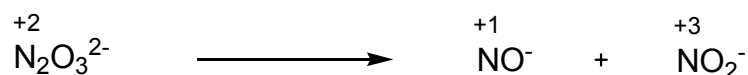


Abb. 94: Angeli's Salz.

Aufgrund des negativen Redoxpotentials des NO/NO^- Paares (-0.8V) ist es unwahrscheinlich, dass das Nitroxylanion ein direktes Reduktionsprodukt des NO darstellt (Bartberger et al., 2002). Da unter bestimmten Bedingungen eine NOS-katalysierte Bildung

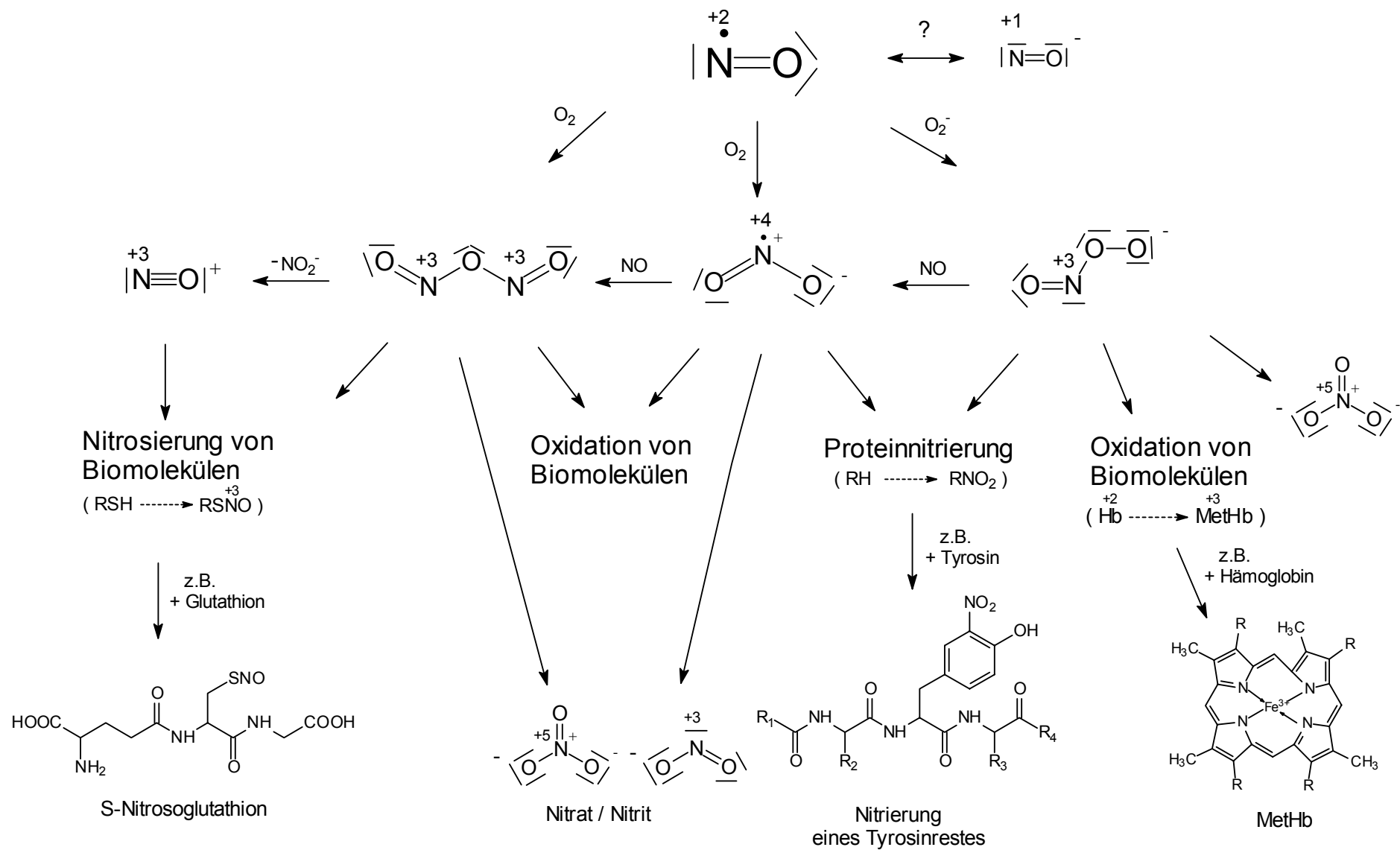


Abb. 95: Schematische Darstellung des NO-Stoffwechsels. Die RNOS (N_2O_3 , NO_2 , ONOO^\cdot) sind metastabil und führen zu Nitrosierungs-, Nitrierungs- und Redoxreaktionen. Ihre stabilen Stoffwechselendprodukte sind S-Nitrosothiole, nitrierte Proteine, Nitrit und Nitrat (Metaboliten mit Oxidationszahlen).

von NO^- beobachtet werden konnte (Miranda, Nims, Thomas, Espey, Citrin, Bartberger, Paolocci, Fukuto, Feelisch, and Wink, 2003), wird angenommen, dass NO^- ebenfalls als *second messenger* fungiert, möglicherweise als Gegenspieler des NO. Ob NO^- als Botenstoff eine ebenso große Bedeutung zugemessen werden muss wie Stickstoffmonoxid, bleibt abzuwarten.

2.1.3. Reaktionen von NO mit Hämoglobin

Reaktionen von Stickstoffmonoxid mit Hämoglobin laufen abhängig vom Partialdruck des Sauerstoffs ($p\text{O}_2$) in arteriellem und venösem Blut unterschiedlich ab. Die Umsetzung von Stickstoffmonoxid und Oxyhämoglobin (HbO_2) zu Nitrat und Methämoglobin in arteriellem Blut spielt bei der Oxidation von NO zu Nitrat, dem wichtigsten Stoffwechselprodukt des NO-Metabolismus, eine entscheidende Rolle (Zinchuk and Dorokhina, 2002).

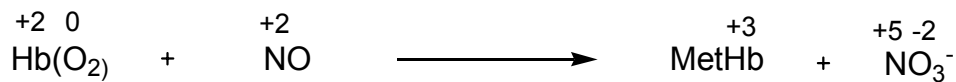


Abb. 96: NO wird durch Oxyhämoglobin zu Nitrat oxidiert.

Daneben wird ein kleinerer Teil des NO zu N_2O_3 oxidiert, welches NO^+ auf den Cys-93 Rest des β -Globins überträgt (Nitrosierung) (Jia et al., 1996).

Neben Oxidation und Nitrosierung ist die Komplexbildung von NO mit Hämoglobin von großer physiologischer Bedeutung - vergleichbar mit der Komplexbildung von NO und sGC. Die Wechselwirkung zwischen NO und Hämoglobin hat einen maßgeblichen Einfluss auf das Atmungssystem und den Sauerstofftransport im Blut (McMahon et al., 2002). Hämoglobin kommt in zwei unterschiedlichen Konformationen vor, der R- und der T-Form (Stamler et al., 1997), die sich in ihrer Affinität zu NO, O_2 und CO_2 unterscheiden (siehe Abb. 97). Die Sauerstoffsättigung des Blutes ($p\text{O}_2$) bestimmt dabei das Gleichgewicht zwischen beiden Formen. In arteriellem Blut liegt Hämoglobin überwiegend in der O_2 -bindenden R-Form, in venösem Blut in der CO_2 -transportierenden T-Form vor. Der Übergang zwischen beiden Konformeren erfolgt jeweils beim Gasaustausch in Lunge oder Gewebe.

Stickstoffmonoxid ist an beide Konformere gebunden, in der R-Form bevorzugt über Sulfhydrylgruppen (SNO-Hb), in der T-Form als Komplex mit Hämeisen ($\text{Hb}[\text{FeNO}]$). NO hat demnach durch die unterschiedlichen Wechselwirkungen mit Hämoglobin und den Einfluss auf die Konformation des Proteins die Fähigkeit, die Hämoglobin-Sauerstoff-Affinität (HOA) und damit den Gasaustausch in Lunge und Gewebe zu beeinflussen. Andererseits vermag Hämoglobin in der R-Form über die S-Nitrosothiolgruppen NO freizusetzen. Dies geschieht abhängig vom Partialdruck des Sauerstoffs. Mit dieser „NO-Bioaktivität“ ausgestattet haben rote Blutkörperchen einen schnellen und der örtlichen Sauerstoffversorgung angepassten Einfluss

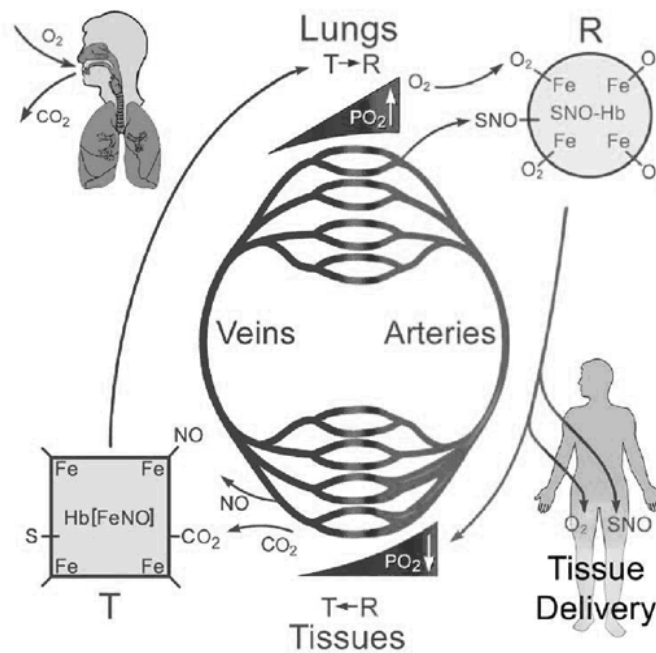


Abb. 97: Vereinfachte Darstellung des menschlichen Atmungssystems aus (McMahon, Moon, Lusching, Carraway, Stone, Stolp, Gow, Pawloski, Watke, Singel, Piantadosi, and Stamler, 2002).

auf Gefäßweite und Gewebedurchblutung. Die O_2 -bindende R-Form geht demnach bei Sauerstoffmangel in die T-Form über und liberiert aus den S-Nitrosothiolgruppen NO. Dadurch wird über die Aktivierung der NO/cGMP-Kaskade die glatte Gefäßmuskulatur relaxiert und es kommt zur Vasodilatation.

2.2. Durchführung und Ergebnis der Metabolitenbestimmung

Ziel des Versuchs war der quantitative Nachweis von NO-Metaboliten aus einer Tierblutprobe nach vorheriger Applikation eines NO-Donors. Die Bestimmung erfolgte durch die chemoselektive Rückführung der Metaboliten zu NO und der nachfolgenden Detektion des Stickstoffmonoxids im Gasraum durch LMRS.

Dazu wurden zunächst 600.0 μ l (375 nmol; 31.25 μ M) der Lösung von **24b** in eine mit 10 ml Schweineblut (37°C; Zusatz von 2 ml Sab Simplex®) gefüllte Durchflusszelle (0.8 l/min) pipettiert und die NO-Liberation aufgezeichnet. Nach Beendigung der spontanen NO-Freisetzung aus dem NONOat wurden anschließend nacheinander die Stoffwechselprodukte Hb(NO), NO_2^- , S-Nitrosothiole und NO_3^- direkt aus der Blutprobe bestimmt. In parallel durchgeführten Blindmessungen wurden deren Konzentrationen in 10 ml Schweineblut ohne vorherige Donor-Zugabe gemessen.

Anhand der freigesetzten Stoffmengen NO war es möglich, auf die jeweils vorliegenden Konzentrationen der Stoffwechselprodukte zu schließen. Die Differenz aus Blind- und

Probenmessung ergab die aus der Donor-Applikation resultierenden Metabolitenkonzentration. Die selektive Umsetzung der Metaboliten zu NO erfolgte direkt im Blut und wurde wie folgt durchgeführt.

2.2.1. Bestimmung des NO-Hämoglobin-Komplexes

Die Bestimmung des NO-Hämoglobin-Komplexes wurde mit der Cyanhämoglobinmethode durchgeführt. Sie beruht auf der hohen Affinität von CN^- zu Eisenionen. CN^- verdrängt eisenständiges NO aus dem Komplex, welches nachfolgend in der Gasphase bestimmt werden kann (Abb. 98). Die hier angewandte cyanidhaltige Reagenzlösung (1.0 mmol/l KCN; 0.6 mmol/l $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$) wurde von der Firma Merck® (Merckotest® [1.03317.0001]) bezogen.



Abb. 98: Cyanid-Ionen verdrängen NO aus dem Hämoglobinkomplex.

Nach der vollständigen Dissoziation des Diazeniumdiolats wurde ein Überschuss der Reagenzlösung (5 ml Merckotest®) in die Zelle pipettiert. Die resultierende NO-Freisetzung wurde aufgezeichnet und ausgewertet (siehe Abb. 99).

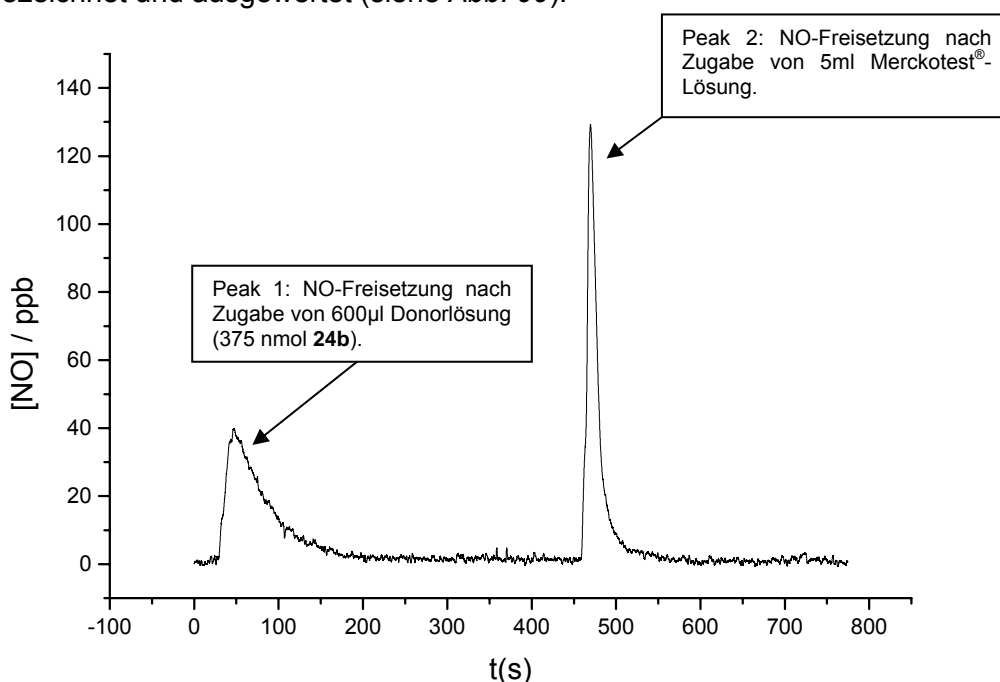


Abb. 99: Beispiel für eine NO-Freisetzungskurve aus **24b** in 10 ml Tierblut (37°C; 0.8l/min; 2 ml Sab Simplex®). Gemittelte Stoffmengen: $n_{(\text{NO})}\text{NONOat}$: 1.5 ± 0.5 nmol (0.2% des theoretisch Möglichen); $n_{(\text{NO})}\text{Hb}(\text{NO})$: 3 ± 1 nmol (0.4%).

Die quantitative Auswertung ergab nach Zugabe des NONOates eine Stoffmenge von 1.5 ± 0.5 nmol Stickstoffmonoxid und nach Merckotest®-Injektion eine Stoffmenge von 3 ± 1 nmol. Dies entspricht einer Konzentration des $\text{HbFe}^{\text{II}}(\text{NO})$ -Komplexes von 0.03 µmol/l. Da bei der

Blindmessung (*Merckotest*[®]-Zugabe ohne vorherige Probeninjektion) keine nachweisbaren Mengen NO freigesetzt werden konnten, ist die ermittelte Konzentration des NO-Hämoglobin-Komplexes allein auf den NO-Donor zurückzuführen.

Wie zuvor erläutert ist die Wechselwirkung zwischen NO und eisenhaltigen Proteinen für die physiologische Wirkung des Stickstoffmonoxids von entscheidender Bedeutung. Als Stoffwechselendprodukte allerdings spielen die $\text{HbFe}^{\text{II}}(\text{NO})$ -Komplexe offenbar nur eine untergeordnete Rolle. Mit einer Konzentration von $0.03 \mu\text{mol/l}$ machen sie gerade 0.4% des liberierten Stickstoffmonoxids (685 nmol) aus. Dies könnte auch auf die geringe Stabilität dieser Komplexe zurückzuführen sein.

2.2.2. Bestimmung des Nitrits

Nach einer von *Yang et al.* beschriebenen Methode kann mit Hilfe einer salzsauren Kaliumiodid-Lösung Nitrit selektiv zu NO reduziert werden (*Abb. 100*) (Yang, Troncy, Francoeur, Vinet, Vinay, Czaika, and Blaise, 1997).

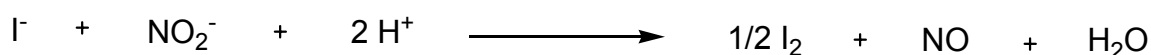
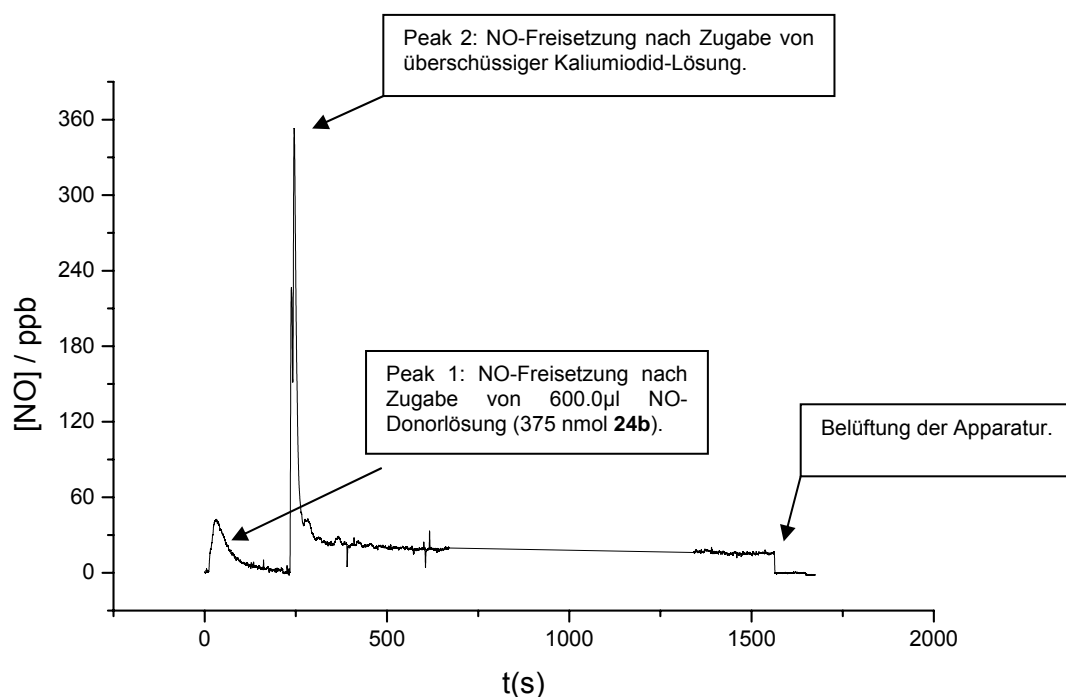


Abb. 100: Schematische Darstellung des Nitrit-Nachweises.

In diesen Versuchen wurde Tierblut mit überschüssiger salzsaurem Kaliumiodid-Lösung (0.1 M KI; 0.1M HCl) versetzt und die NO-Liberation durch LMRS im Gasraum aufgezeichnet. *Abb. 101* zeigt das Freisetzungsprofil.



*Abb. 101: Beispiel einer NO-Freisetzungskurve von **24b** in 10 ml Tierblut (37°C; 0.8 l/min; 2 ml Sab Simplex[®]). Gemittelte Stoffmengen $n_{(\text{NO})\text{NONOat}}$: $1.5 \pm 0.5 \text{ nmol}$ (0.2% des freigesetzten NO)); $n_{(\text{NO})\text{NO}_2^-}$: 46 nmol (7%; extrapolierter Wert).*

Nach der Injektion des NONOates kommt es zunächst zur spontanen NO-Freisetzung (Signalmaximum bei 60 s). Nach Zugabe der Kaliumiodid-Lösung wird das NO aus Nitrit frei. Das Freisetzungsprofil zeigt hier einen charakteristischen Verlauf: einem kurzen Maximum (hier bei 250 s) folgt ein auf niedrigem Niveau verlaufender, sehr langsam abfallender Teil des Graphen - mit einem fast waagerechten Kurvenverlauf. Nach 30 Minuten wird die Apparatur gelüftet. *Abb. 101* zeigt einen deutlichen Signalabfall nach der Belüftung der Apparatur. Bis zu diesem Zeitpunkt war also die Liberation signifikanter Mengen NO zu beobachten. Der abfallende Teil der Kurve (zwischen 500 und 1700 Sekunden) wird daher extrapoliert, der gesamte Graph quantitativ ausgewertet. Die Extrapolation und Auswertung ergibt für Peak 2 aus *Abb. 101* eine Nitritmenge von 46 nmol (0.46 $\mu\text{mol/l}$).

Für das charakteristische Freisetzungsprofil der Nitritbestimmung sind folgende Gründe denkbar:

- Die Reduktion des Nitrits durch KI/HCl verläuft schleppend. Untersuchungen von *Menzel et al.* bestätigen eine langsame Abklingzeit des NO-Signals (Menzel, 2000). Die direkte Bestimmung aus der Blutlösung in unserem Versuch trägt zur weiteren Verzögerung bei.
- Durch Hydrolyse wird aus S-Nitrosothiolen nach und nach Nitrit gebildet, das dann zu NO umgesetzt wird.
- Gespeichertes NO bzw. Nitrit wird aus weiteren Biomolekülen wie SNO-Hb oder Hb(NO) freigesetzt und durch den Überschuss an Kaliumiodid zu Stickstoffmonoxid reduziert.

Die Auswertung der Nitritbestimmung offenbart große Schwankungen. Trägt man die Mengen freigesetzten Stickstoffmonoxids gegen die Zeit auf, die zwischen Donorapplikation und Nitritnachweis verstrichen ist, so kommt man zu der in *Abb. 102* dargestellten Grafik.

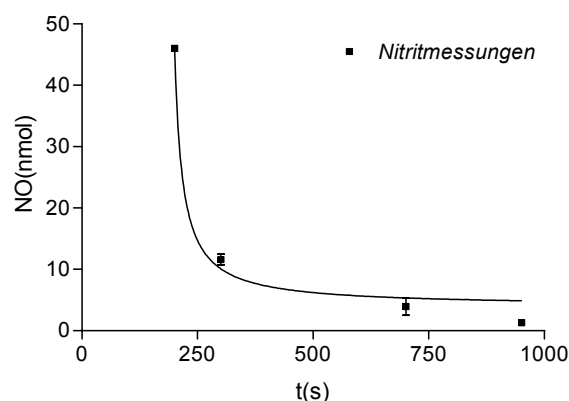


Abb. 102: Abnahme des Nitritgehaltes in Abhängigkeit von der Zeit zwischen NONOat-Applikation und Nachweis. Nach 15 Minuten belief sich der Anteil nur noch auf 5-15% des ursprünglichen Nitritwertes.

Danach wird umso weniger NO aus Nitrit freigesetzt, je später die KI/HCl Lösung nach der Donor-Applikation zugefügt wurde. Nach 15 Minuten beläuft sich der Anteil nur noch auf 5-15% des maximalen Nitritwertes. Die Nitritkonzentration nimmt demnach zeitabhängig ab - bedingt

etwa durch einen enzymatischen Abbau. Aus Blut, dem kein NONOat zugegeben wurde (Blindprobe), kann indessen kein NO freigesetzt werden. Demnach liegt Nitrit physiologisch in der Blutlösung nicht vor. Die in der Blutprobe nach Donorapplikation erfasste Nitritmenge ist folglich allein auf die Verstoffwechselung des freigesetzten NO zurückzuführen. In diesen Versuchen konnten 46 nmol NO (0.46 µmol/l; 7% des maximal Möglichen) detektiert werden. Nitrit ist demnach ein wichtiger aber, angesichts des schnellen Übergangs in Nitrat, ein transients Metabolit des liberierten NO.

2.2.3. Bestimmung der S-Nitrosothiole

Quecksilber-Ionen katalysieren die Freisetzung von NO aus S-Nitrosothiolen (Abb. 103) (Saville, 1958). Liberiertes NO kann in die Gasphase treten und durch LMRS vermessen werden.



Abb. 103: Quecksilber-Ionen verdrängen NO aus S-Nitrosothiolen.

Nach Saville wird allerdings ein Teil des NO vor dem Übergang in die Gasphase zu NO_2^- oxidiert. Ein nach Zugabe von HgCl_2 beobachteter NO-Peak (wie Peak 2 in Abb. 104 links) weist daher zwar die Bildung von Nitrosothiolen aus dem NONOat nach, erfasst aber vermutlich nicht die gesamte Menge. Daher wurde in diesen Versuchen nach der Zugabe einer überschüssigen 0.1 M HgCl_2 Lösung ein Nitritnachweis durchgeführt. Abb. 104 links zeigt das Versuchsergebnis.

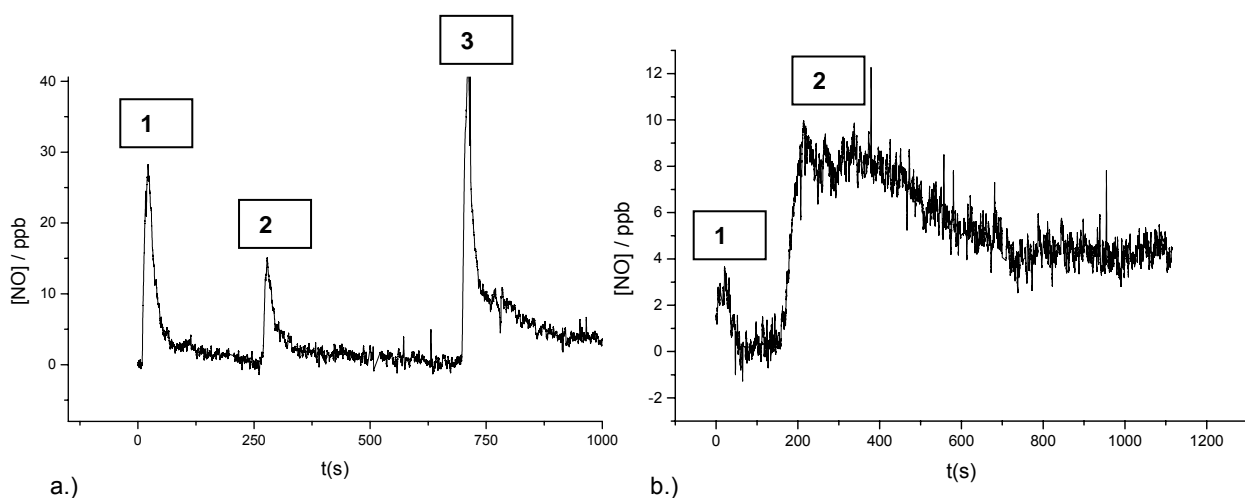


Abb. 104: Bestimmung von S-Nitrosothiolen in Tierblut (10 ml; 37°C; 0.8l/min; Zusatz von 2 ml Sab Simplex®). a.) Peak 1: spontane Freisetzung nach Zugabe von 375 nmol **24b**, Peak 2: Zugabe von 5 ml einer 0.1 M HgCl_2 , Peak 3: Zugabe von 5 ml KI-Lösung (0.1 M KI; 0.1M HCl). $n_{(\text{NO})}\text{NONOat}$: 1.5 nmol; $n_{(\text{NO})}\text{HgCl}_2$: 0.5 nmol; $n_{(\text{NO})}\text{KI}$: 11.8 nmol. b.) Blindmessung ohne **24b**. Peak 1: HgCl_2 , Peak 2: KI/HCl. $n_{(\text{NO})}\text{HgCl}_2$: 0.05 nmol; $n_{(\text{NO})}\text{KI/HCl}$: ca. 5 nmol (nach Extrapolation).

In Peak 3 (*Abb. 104a*) wird mit Abstand die größte Menge an NO gefunden. Da dieser „Nitritpeak“ aber nicht signifikant flächengrößer ist als ein „Nitritpeak“, der aus dem Blut+Diazeniumdiolat+KI-Versuch erhalten wird, könnte man annehmen, dass Peak 2 doch ein gutes Maß für den tatsächlichen Nitrosothiol-Gehalt darstellt. Dem widerspricht allerdings ein Versuch mit Blut, dem kein NONOat zugefügt wurde (*Abb. 104b*). Denn in mit HgCl₂ (Peak 1 *Abb. 104b*) behandeltem reinem Blut wird mit nachfolgendem KI/HCl (Peak 2 *Abb. 104b*) ein deutliches NO-Signal erhalten. Wie zuvor beschrieben liegt Nitrit allerdings in einer nicht mit HgCl₂ behandelten Blutprobe nicht vor. Demnach kann das nachgewiesene NO einzig aus natürlichen Nitrosothiolen stammen. Die ausgewerteten Signale ergeben eine physiologische Konzentration von 0.05 µmol/l.

2.2.4. Bestimmung des Nitrats

Die Rückführung von Nitrat zu NO erfolgte in der Hitze mit Vanadiumsalzen als Reduktionsmittel. Die Methode wurde von *Yang et al.* beschrieben und lässt eine quantitative Erfassung von NO₃⁻ aus dem Blutserum zu (Yang, Troncy, Francoeur, Vinet, Vinay, Czaika, and Blaise, 1997). Da Nitrit und Nitrat gleichermaßen durch V³⁺ zu NO umgesetzt werden, muss der Nitrat- grundsätzlich nach dem Nitritnachweis erfolgen. Die Reduktion verläuft nach der Gleichung in *Abb. 105*.

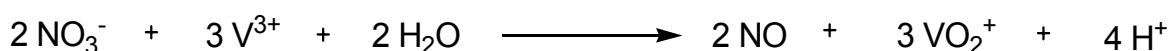


Abb. 105: Reduktion von Nitrat mit Vanadiumchlorid.

In diesen Versuchen wurde ein Überschuss von 5 ml einer 0.1 M VCl₃ Lösung (0.1 +M HCl) in zuvor auf 90°C erhitztes Blut gegeben. Die Messung wurde nach mehreren Stunden abgebrochen und der Kurvenverlauf extrapoliert und ausgewertet. Mit einer Blindprobe wurde auf die gleiche Weise der natürliche Nitratgehalt der Blutlösung bestimmt und von der Analysenlösung abgezogen.

Für die Blindprobe konnte ein Nitratwert von ca. 255 nmol (2.55 µmol/l) ermittelt werden, für die Analyse ein Nitratwert von ca. 550 nmol (5.5 µmol/l). Das bedeutet, rund 295 nmol (2.95 µmol/l) Nitrat sind durch die Dissoziation des NONOates entstanden, das entspricht 43% des Gesamtwertes von 685 nmol. Die Nitratkonzentration ohne Donorzugabe betrug 2.55 µmol/l (Vgl. Literatur: 15 µmol/l (Derici and Ozkaya, 2002); 63 µmol/l (Schumacher et al., 2001)). Somit konnte Nitrat als Hauptmetaboliten des aus Diazeniumdiolaten freigesetzten Stickstoffmonoxids identifiziert werden. Allein 43% des aus **24b** liberierten NO fielen auf den Nitratwert.

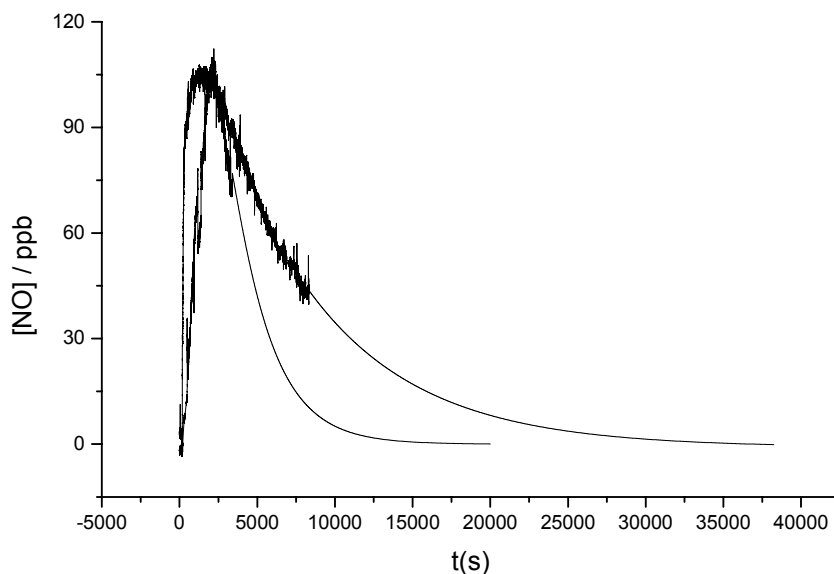


Abb. 106: Nitratnachweis mit V^{3+} in Tierblut (10 ml; 90°C; 0.8 l/min; Sab Simplex®). Freisetzungskurve 1 (bis 20000 s): ohne vorherige Donorapplikation (Blindprobe), Freisetzungskurve 2 (bis 37000 s) Nitratnachweis nach Zugabe von **24b**. $n_{(NO)}\text{Blind}$: ca. 255 nmol (2.55 $\mu\text{mol/l}$); $n_{(NO)}\text{Analyse}$: ca. 550 nmol (5.5 $\mu\text{mol/l}$); $n_{(NO)}\text{Analyse-Blind}$: 295 nmol (2.95 $\mu\text{mol/l}$).

Die Umsetzung von Nitrat zu NO mit Hilfe von VCl_3 ist aufgrund der dafür notwendigen Temperatur und der über mehrere Stunden andauernden NO-Freisetzung problematisch. Zum einen kann aufgrund der begrenzten Laufleistung des Lasers die Messung nicht bis zum Ende verfolgt werden. Zum anderen verdunsten bei einer Reaktionstemperatur von 90°C große Mengen Wasser. Durch die Kondensation des Wasserdampfes in der Messzelle kann es zu Störungen kommen, die die Messempfindlichkeit beeinträchtigen und ebenfalls zu einem vorzeitigen Abbruch der Messung führen können. Mit einem Kühler, der zwischen Zelle und Detektionseinheit geschaltet wird, könnte die Versuchsanordnung optimiert werden.

2.3. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit werden erstmals mit Hilfe der LMRS durchgeführte Versuche zur Bestimmung der Stoffwechselprodukte von NO aus Diazeniumdiolaten in Tierblut beschrieben. Setzt man NO aus 375 nmol des Diazeniumdiolats **24b** in einem wässrigen Puffer von pH 7.4 bei 37°C frei, so findet man 685 nmol NO (91% des maximal Möglichen).

Führt man den gleichen Versuch in Tierblut bei 37°C durch, so findet man nur 1.5 nmol (0.2%) NO im Gasraum, 295 nmol (43%) als NO_3^- und maximal 45 nmol als NO_2^- (7%). HbNO-Komplexe und S-Nitrosothiole machen zusammen weniger als 1% des freigesetzten NO aus. Über die restlichen 53% können nach diesen Versuchen keine Angaben gemacht werden.

In Tab. 11 sind die Ergebnisse der quantitativen Auswertung abschließend zusammengefasst, Abb. 107 stellt das NO-Freisetzungsprofil des Nitrit-, Nitrat- und HbNO-Nachweises nach Applikation von **24b** dar.

Tab. 11: LMRS-Bestimmung der Metabolitenkonzentration aus 10 ml Blutlösung nach vorheriger NO-Donor-Applikation (375 nmol **24b**) durch deren selektive Rückführung zu NO. Die freigesetzten Stoffmengen NO sind angegeben in nmol, die Konzentrationen der Stoffwechselprodukte in $\mu\text{mol/l}$.

NO-Freisetzung aus	Analysenmessung (Blut + NONOat)		Blindmessung (nur Blut)		Metaboliten (Analyse minus Blindwert)	
	nmol	$\mu\text{mol/l}$	nmol	$\mu\text{mol/l}$	nmol	$\mu\text{mol/l}$
24b	1.5 \pm 0.4	-	-	-	-	-
HbFe ^{II} (NO)	3 \pm 1	0.03	0	0	3 \pm 1	0.03
S-Nitrosothiole	-	-	5	0.05	-	-
NO ₂ ⁻	46	0.46	0	0	45	0.45
NO ₃ ⁻	550	5.5	255	2.55	295	2.95

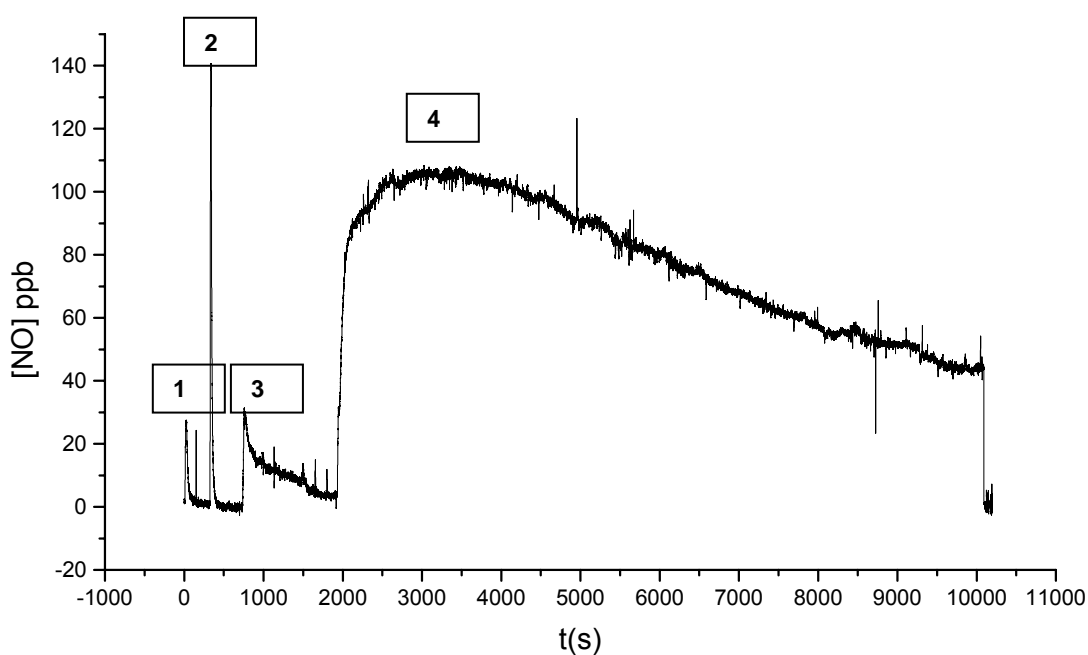


Abb. 107: NO-Freisetzungsprofil nach selektiver Rückführung der Metaboliten zu NO. Peak 1: Zugabe von 375 nmol **24b** (1.5 nmol NO). Peak 2: Hb-NO-Nachweis (3 nmol NO), Peak 3: NO₂⁻ Nachweis (45 nmol NO), Peak 4: NO₃⁻ Nachweis (550 nmol NO).

Da die NO-Verstoffwechselung, die zu aktiven (z.B. S-Nitrosothiolen) und inaktiven (z.B. NO₂⁻; NO₃⁻) Produkten führt, von erheblicher physiologischer Bedeutung ist, bedürfen die hier gefundenen Resultate einer gründlichen Absicherung, die im Rahmen dieser Untersuchung nicht mehr möglich war.

3. Untersuchungen zur Vasorelaxation an Koronararterien

Anionische Diazeniumdiolate sind direkte NO-Donoren. Sie setzen Stickstoffmonoxid durch Dissoziation und ohne Beteiligung körpereigener Enzymsysteme frei. Damit stellen sie hoch potente Vasodilatoren dar, bei denen möglicherweise auch keine Toleranzerscheinungen zu erwarten sind.

Aus den vorangegangenen Kapiteln geht hervor, dass NONOate zwar zuverlässig NO liberieren, das zeitliche Freisetzungsprofil aber von der molekularen Struktur des Donors abhängig ist. Es konnten Zerfallshalbwertszeiten von wenigen Sekunden bis zu mehreren Stunden ermittelt werden.

Es stellt sich die Frage, ob und wie weit die ermittelten Freisetzungsprofile mit Vasorelaxationsprofilen an Koronararterien korrelieren. Zu diesem Zweck wurden die nachfolgend kurz beschriebenen Untersuchungen von Frau Imke Pietig im Arbeitskreis von Prof. Dr. U. Fricke am Pharmakologischen Institut der Universität Köln durchgeführt.

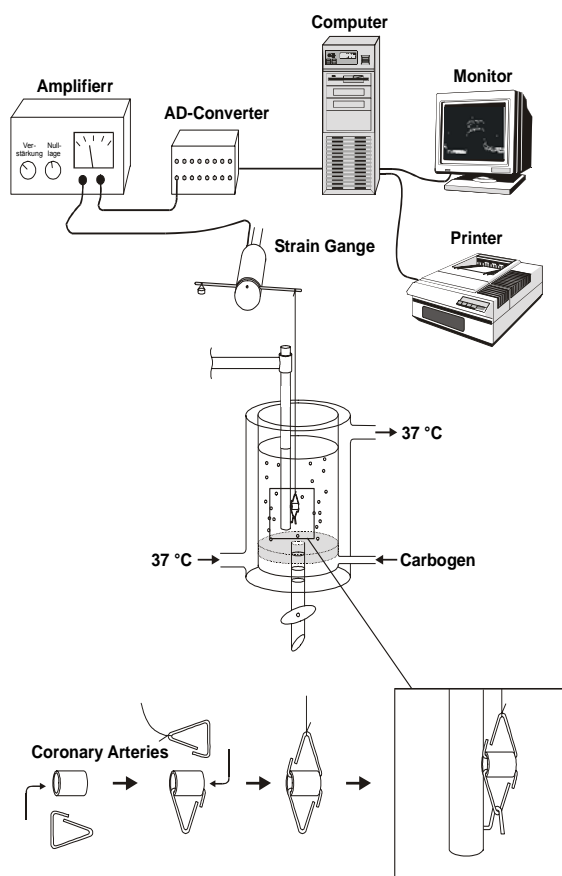


Abb. 108: Myograph.

3.1. Methode

Die vasorelaxierende Wirkung der NONOate wurde an Koronararterien des Hausschweins untersucht. Für diesen Versuch wurden wie in Abb. 108 schematisch dargestellt frisch präparierte Gefäßsegmente in das Organbad einer myographischen Versuchsanordnung gehängt. Mit Hilfe des Myographen war es möglich, den Tonus der glatten Gefäßmuskulatur zu verfolgen. Nach einer rezeptorvermittelten Vorkontraktion mit Prostaglandin $F_{2\alpha}$ wurden die Gefäßsegmente jeweils mit einer Verdünnungsreihe der Testverbindungen kumulativ versehen. Dabei entsprach das Ausmaß der Vorkontraktion mit $PGF_{2\alpha}$ einer 100%-igen Kontraktion. Der durch die Verdünnungsreihe bewirkte prozentuale Grad der Relaxation wurde relativ zur Vorkontraktion berechnet.

Durch Inaktivierung des Endothels mittels N-Nitro-L-arginin (L-NNA), einem kompetitiven Inhibitor der endothelen NO-Synthase, konnte darüber hinaus der Einfluss des Endothels auf die vasodilatatorische Potenz der Verbindungen untersucht werden.

Nitrattolerante Arterien wurden durch eine dreimalige Gabe von GTN in dreißigminütigen Intervallen erzeugt.

3.2. *Vasodilatation an intakten Koronararterien des Hausschweins*

Zur Auswertung der Versuche wird das Ausmaß der Relaxation (in Prozent) gegen die kumulierten Konzentrationen der NO-Donoren aufgetragen. Die so erhaltenen Relaxationskurven zeigen, dass die vermessenen Zielverbindungen ausgeprägt vasodilatierende Eigenschaften besitzen. Die Bestimmung der halbmaximalen Wirkstärke (EC₅₀-Werte) ergibt für alle untersuchten Diazeniumdiolate ein höheres vasodilatatorisches Potential als für die Vergleichssubstanzen GTN, PETN und SIN-1a.

Das NONOat der Piperidin-4-carbonsäure **21k** erweist sich mit einem EC₅₀-Wert von $1.4 \cdot 10^{-8}$ mol/l als die Zielstruktur mit der höchsten Aktivität an endothelhaltigen Gefäßen. Es ist damit 50mal stärker als GTN ($6.3 \cdot 10^{-7}$ mol/l) und zeigt eine 100fach höhere Aktivität als PETN ($1.6 \cdot 10^{-6}$ mol/l). Auch die Derivate des Phenylpiperazins **24d** ($3.0 \cdot 10^{-8}$ mol/l) und der Piperidin-2-Carbonsäure **21g** ($4.9 \cdot 10^{-8}$ mol/l) vasodilatieren deutlich stärker als die Standardverbindungen. Selbst die Diazeniumdiolate mit der mit Abstand geringsten Aktivität **17** ($3.5 \cdot 10^{-7}$ mol/l) und **21b** ($4.1 \cdot 10^{-7}$ mol/l) sind viermal stärker als PETN ($1.6 \cdot 10^{-6}$ mol/l).

Abb.109 zeigt exemplarisch die Relaxationskurven von **21g**, **21k** und **21b** mit dem Standard GTN (**3**).

3.3. *Vasodilatation an mit L-NNA präinkubierten Koronararterien*

In zahlreichen literaturbekannten Untersuchungen wurde festgestellt, dass der Zustand des Gefäßendothels erheblichen Einfluss auf die Aktivität organischer Nitrate hat. So wurde bei GTN in vitro eine verstärkte vasodilatatorische Potenz an deendothelisierten und L-NNA-geblockten Gefäßen beobachtet. Dies wird mit einer erhöhten Empfindlichkeit der löslichen Guanylatcyclase im Sinne einer Upregulation erklärt. Mit unseren Versuchsergebnissen können wir diese Hypothese nicht bestätigen. Zwar erhöht sich die Aktivität von GTN und PETN deutlich bei den mit L-NNA vorbehandelten Gefäßen. Bei den Diazeniumdiolaten ist dagegen keine Erhöhung der Wirkstärke zu beobachten. Im Gegenteil: bei den Verbindungen **21k**, **24d** und **21g**, die an den endothelhaltigen Gefäßen die höchste Aktivität aufwiesen, ist die Wirkstärke bis zu 100fach verringert.

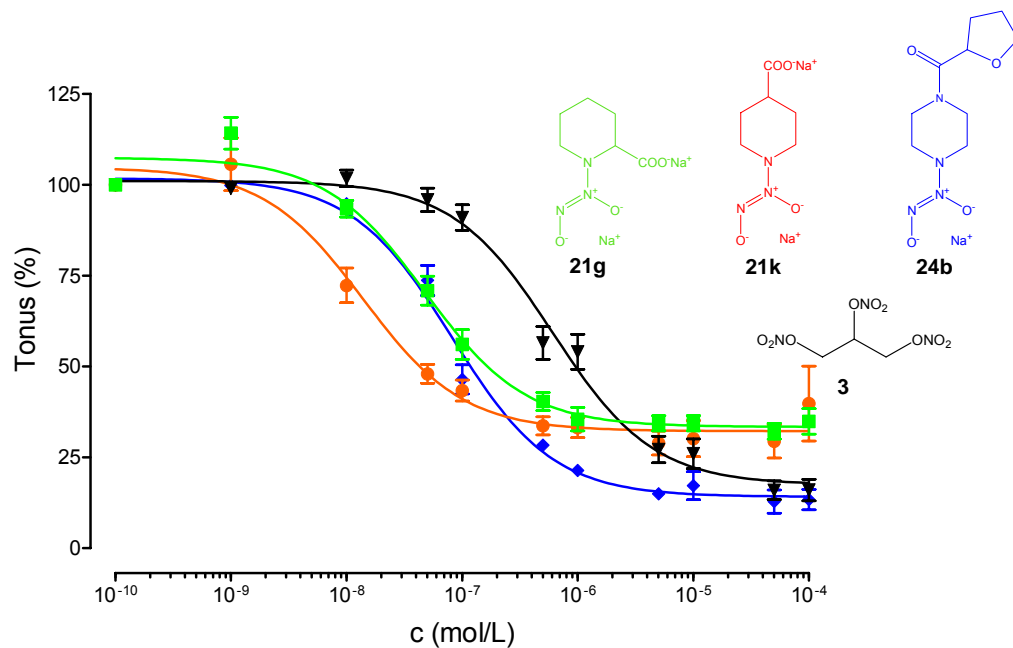


Abb. 109: Relaxationskurven von **21g**, **21k**, **24b** im Vergleich zu GTN (**3**). Die Abbildung zeigt den Einfluss steigender Konzentrationen auf den Gefäßtonus PGF_{2α}-vorkontrahierter, endothelhaltiger Koronararterien des Hausschweins. Dargestellt sind die Mittelwerte und deren Standardabweichungen.

Bei den übrigen NONOaten ist ebenfalls ein Wirkungsverlust festzustellen. Da alle NO-Donoren gleichermaßen die Guanylatcyclase aktivieren, reicht eine erhöhte Empfindlichkeit der Guanylatcyclase als Erklärung für die verstärkte vasodilatatorische Potenz der organischen Nitrate nicht aus.

3.4. Vasodilatation an toleranten Koronararterien

Eine eindeutige Kreuz-Toleranz mit GTN (**3**) ist bei den untersuchten NONOaten nicht festzustellen. Zwar ergeben sich mit Blick auf Tab. 12 Unterschiede zwischen der Relaxation an toleranten Gefäßen und Kontrolle, allerdings kann eine eindeutige Tendenz nicht ausgemacht werden. Während bei **24d** keine Veränderung festgestellt werden kann, ist bei **21b**, **21k** und **13a** sogar eine leichte Erhöhung der Aktivität an toleranten Gefäßen zu beobachten. Lediglich **21g** (!), **24b** und **17** vasodilieren deutlich schwächer an mit GTN (**3**) vorbehandelten Gefäßen. Abb. 110 zeigt den Einfluss der Nitrattoleranz auf die Aktivität von **3** und **21k**.

3.5. Relaxationsgeschwindigkeit und Reversibilität

Während die ermittelten EC₅₀-Werte und die mittels LMRS gemessenen Zerfallshalbwertszeiten der Diazeniumdiolate keine eindeutige Korrelation erkennen lassen, ergeben unsere Versuche einen Zusammenhang zwischen der Relaxationsgeschwindigkeit der Gefäße und deren Reversibilität einerseits und der Zerfallsgeschwindigkeit der NONOate andererseits. Die schnell

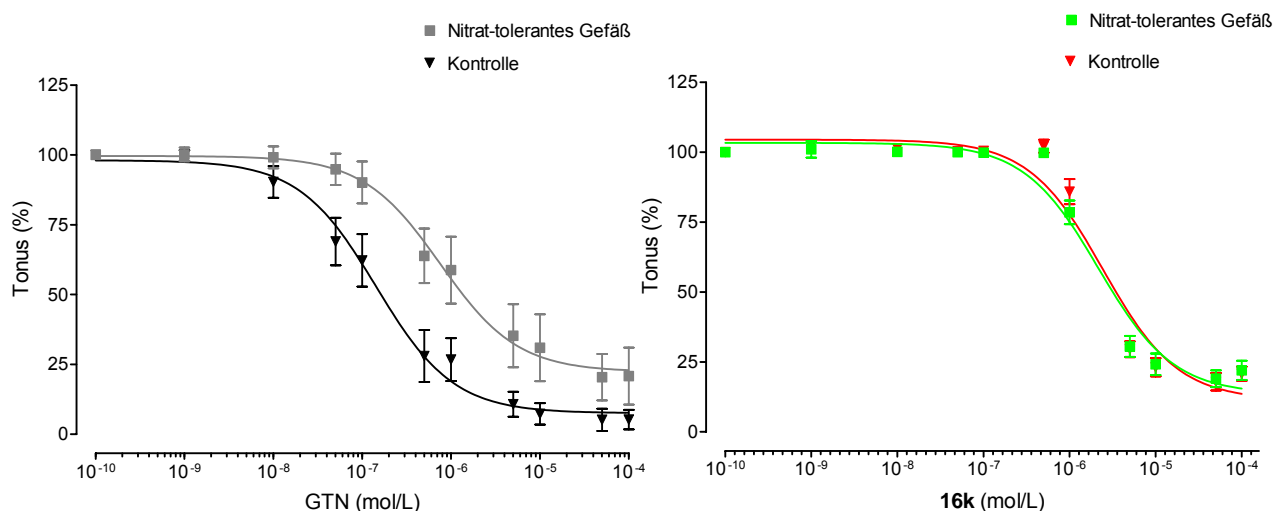


Abb. 110: Links: Einfluss der Nitrattoleranz auf die Aktivität von GTN, wobei eine Rechtsverschiebung zu beobachten ist. Rechts: Kreuz-Toleranz von GTN und **21k**. Der Verlauf der Relaxationskurve ist unverändert.

freisetzenden Verbindungen **21g** und **21k** weisen eine Relaxationshalbwertszeit von nur 37 bzw. 34 Sekunden mit einer Reversibilität von 48 bzw. 41 Sekunden auf. Unterdessen beobachten wir bei **24b** eine Relaxation von 90 Sekunden und eine deutlich längere Reversibilitätshalbwertszeit von 541 Sekunden.

Indes zeigen die Standards GTN und PETN keine Reversibilität. Nur die Vergleichssubstanzen SNAP und SIN-1a haben mit Werten von 568 bzw. 889 Sekunden eine Reversibilitätshalbwertszeit in der Größenordnung von **24b**. In Abb. 111 sind exemplarisch die Echtzeitaufnahmen der Verbindungen **21k** und **24b** im Vergleich zu GTN abgebildet.

3.6. Diskussion und Zusammenfassung

Es ist festzustellen, dass an intakten Gefäßen alle vermessenen Diazeniumdiolate eine höhere vasodilatatorische Aktivität besitzen als die zum Vergleich herangezogenen organischen Nitrate. Eine Korrelation zwischen Aktivität und Zerfallshalbwertszeit der NONOate kann indes mit den erhaltenen Werten nicht eindeutig festgestellt werden. Die Piperidincarbonsäuren gehören zu den aktivsten Verbindungen. **21g** und **21k** zeigen eine ähnliche vasodilatatorische Potenz, obwohl im Freisetzungversuch nur **21g** die Eigenschaften eines *ultrafast NO-donors* aufweist. Es ist anzunehmen, dass der Gasfluss der myographischen Apparatur bei schnell freisetzenden NONOaten zu einem Verlust von Stickstoffmonoxid führt, bevor eine Wirkung an den Arterien zu beobachten ist. Auch die Untersuchungen an mit L-NNA präinkubierten und toleranten Gefäßen ergeben kein einheitliches Ergebnis. Dies ist umso erstaunlicher, als man von direkten NO-Donoren, die keiner Aktivierung durch körpereigene Enzymsysteme bedürfen,

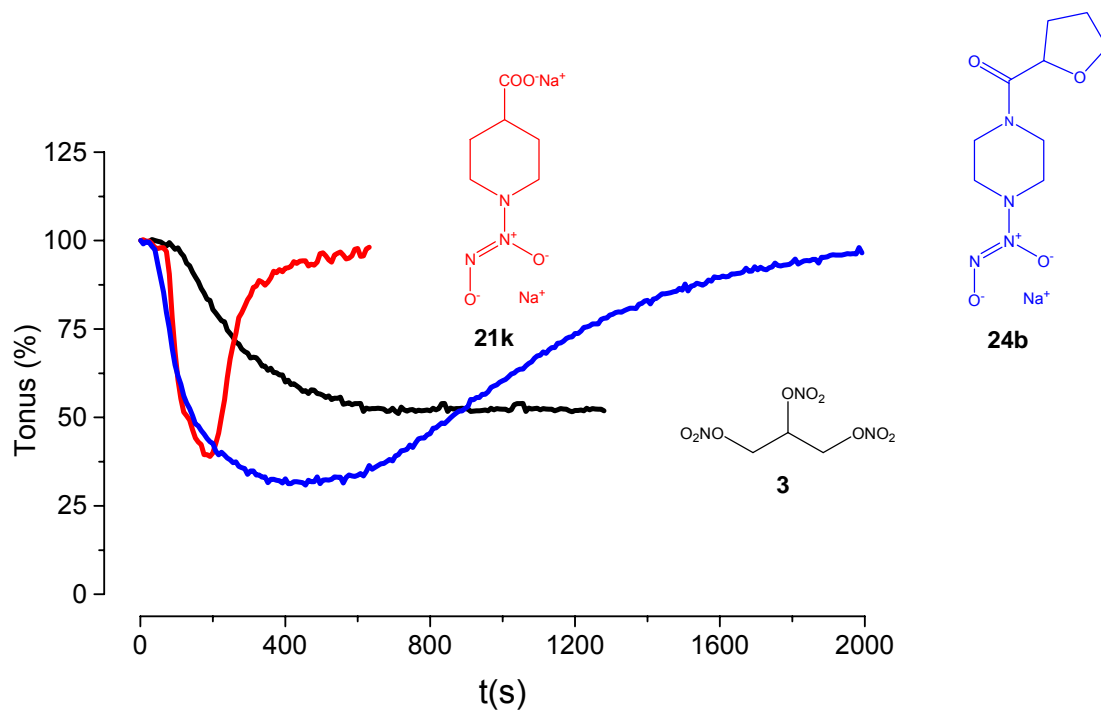


Abb. 111: Kinetik von GTN (**3**), **21k** und **24b** an $\text{PGF}_{2\alpha}$ vorkontrahierten Koronararterien. Relaxation $t_{1/2}(\mathbf{21k})$: $34 \pm 2\text{s}$; $t_{1/2}(\mathbf{24b})$: $90 \pm 1\text{s}$; $t_{1/2}(\mathbf{3})$: $168 \pm 21\text{s}$. Reversibilität $t_{1/2}(\mathbf{21k})$: $41 \pm 2\text{s}$; $t_{1/2}(\mathbf{24b})$: $541 \pm 12\text{s}$; $t_{1/2}(\mathbf{3})$: keine. Zerfall $t_{1/2}(\mathbf{21k})$: 105s ; $t_{1/2}(\mathbf{24b})$: 1100s ; $t_{1/2}(\mathbf{3})$: kein Zerfall (Erläuterung siehe Tab. 12).

eine Abhängigkeit vom Zustand des Gefäßendothels oder eine Entwicklung von Toleranzerscheinungen nicht erwartet. Um diesen Sachverhalt zu klären, sollten später weitere Versuche mit einer größeren Anzahl von Diazeniumdiolaten unternommen werden. Festzuhalten bleibt allerdings, dass bei den Versuchsreihen (1: intaktes Endothel; 2: L-NNA; 3: tolerante Gefäße) im Vergleich zu den übrigen NO-Donoren immer Diazeniumdiolate die höchste Aktivität aufweisen (Tab. 12).

Untersuchungen zu Relaxation und Reversibilität der Gefäße beim Einsatz unterschiedlich schnell freisetzender Diazeniumdiolate offenbaren einen Zusammenhang zwischen den mit Hilfe der LMRS ermittelten Zerfallshalbwertszeiten und der Gefäßmotorik. Wie angenommen sind die Halbwertszeiten von Relaxation und Reversibilität bei kurzlebigen Diazeniumdiolaten klar niedriger als bei langsam freisetzenden Verbindungen. Durch die Ermittlung der Zerfallshalbwertszeiten ist man demnach in der Lage, Aussagen über die Geschwindigkeit der Gefäßreaktion zu treffen.

Tab. 12: Ergebnisse der Untersuchungen zur Vasorelaxation an Koronararterien geordnet nach fallender Aktivität am intakten Gefäß.

Nr.	Struktur	Endothel ¹ EC ₅₀ (mol/l) / rel. Akt. ⁶	L-NNA ² EC ₅₀ (mol/l) / rel. Akt. ⁶	L-NNA u. tolerant ³ EC ₅₀ (mol/l) / rel. Akt. ⁶	Relaxation ⁴ (t _{1/2} in s)	Reversibilität ⁴ (t _{1/2} in s)	Zerfall ⁵ (t _{1/2} in s)
21k		1.4·10 ⁻⁸ / 100%	1.9·10 ⁻⁶ / 4%	1.7·10 ⁻⁶ / 3%	34±2	41±2	105
24d		3.0·10 ⁻⁸ / 47%	5.0·10 ⁻⁷ / 16%	5.5·10 ⁻⁷ / 9%	69±4	314±20	630
21g		4.9·10 ⁻⁸ / 29%	1.0·10 ⁻⁶ / 8%	2.1·10 ⁻⁶ / 2%	37±3	48±7	30
24b		6.6·10 ⁻⁸ / 21%	1.1·10 ⁻⁷ / 74%	2.1·10 ⁻⁷ / 24%	90±1	541±12	1100
13a		9.7·10 ⁻⁸ / 14%	8.3·10 ⁻⁸ / 93%	5.0·10 ⁻⁸ / 100%	k.A.	k.A.	460
12	SNAP	1.7·10 ⁻⁷ / 8%	2.0·10 ⁻⁷ / 40%	3.3·10 ⁻⁷ / 15%	109±7	568±25	k.A.
17		3.5·10 ⁻⁷ / 4%	7.8·10 ⁻⁸ / 100%	1.7·10 ⁻⁷ / 30%	k.A.	k.A.	1150
21b		4.1·10 ⁻⁷ / 3%	1.2·10 ⁻⁷ / 63%	8.2·10 ⁻⁸ / 61%	k.A.	k.A.	280
10	SIN-1a	4.6·10 ⁻⁷ / 3%	1.0·10 ⁻⁷ / 80%	1.1·10 ⁻⁷ / 45%	212±13	889±118	k.A.
3	GTN	6.3·10 ⁻⁷ / 2%	8.9·10 ⁻⁸ / 87%	4.7·10 ⁻⁷ / 11%	168±21	Keine Revers.	k.A.
6	PETN	1.6·10 ⁻⁶ / <1%	1.4·10 ⁻⁷ / 54%	2.1·10 ⁻⁷ / 24%	136±1	Keine Revers.	k.A.

1: Vasodilatation an intakten Koronararterien.

2: Vasodilatation an mit L-NNA präinkubierten Koronararterien.

3: Vasodilatation an toleranten Koronararterien (L-NNA).

4: Relaxations- und Reversibilitätshalbwertszeiten ± STABW.

5: Zerfallshalbwertszeiten ermittelt mit Hilfe der LMRS bei pH 7.4 und 20°C.

6: „rel. Akt.“ bedeutet relative Aktivität bezogen auf wirksamste Verbindung der Versuchsreihe (100%).

D Zusammenfassung

Die Entdeckung der bioregulativen Rolle des Stickstoffmonoxids bei physiologischen und pathophysiologischen Prozessen führte zur Entwicklung einer Reihe neuartiger NO-Donoren. Neben den therapeutisch angewandten organischen Nitraten gewinnen zunehmend hoch potente NO-Donoren wie S-Nitrosothiole und Diazeniumdiolate (NONOate) an Bedeutung. Thema dieser Arbeit war die Synthese, Analytik und pharmakologische Evaluierung von anionischen N-Diazeniumdiolaten. Für diese Gruppe von direkten NO-Donoren sollten allgemeine Struktur-Freisetzungsbeziehungen erarbeitet und diese mit den Ergebnissen pharmakologischer Tests verglichen werden.

Die Diazeniumdiolate wurden durch Umsetzung von sekundären Aminen mit Stickstoffmonoxid unter erhöhtem Druck dargestellt. Zur Anwendung des hochreaktiven NO unter Ausschluss von Sauerstoff wurde eine geeignete Syntheseapparatur entwickelt.

Als Grundgerüst für die Zielverbindungen wählten wir Pyrrolidin, Piperidin, Piperazin und Tetrahydroisochinolin sowie einige offenkettige Amine. Die Auswahl der Substituenten richtete sich nach sterischen und elektronischen Parametern. Unterschiedliche Substitutionsmuster durch Alkyl-, Aryl-, Carbonsäure- und Carbonsäureamid-Gruppen ermöglichten eine signifikante sterische und elektronische Verschiedenheit der Zielstrukturen.

Abhängig von der molekularen Struktur des Eduktes verliefen die NONOat-Synthesen unterschiedlich. Die Darstellung des Piperidin-NONOates gelang problemlos, die der an den Position 2 und 6 mehrfach alkylierten Piperidinderivate misslang, die monoalkylierten Analoga konnten nicht analysenrein gewonnen werden. Raumerfüllende Gruppen in der Nähe des reaktiven Zentrums verhindern demnach die NONOat-Synthese und begünstigen die Bildung von Nebenprodukten. Carbonsäure- und Carbonsäureamid-Funktionen begünstigen dagegen die Umsetzung mit NO, Aminosäuren lassen sich folglich leicht in Diazeniumdiolate überführen. Die Gewinnung der O²-alkylierten Diazeniumdiolate, also Diazeniumdiolat-Prodrugs erfolgte durch Umsetzung der anionischen NONOate mit Alkylhalogeniden.

Für die Untersuchung des NO-Freisetzungsverhaltens der synthetisierten NONOate setzten wir erstmals die Technologie der Laser Magnet Resonanz Spektroskopie ein. Wir entwickelten geeignete Versuchsanordnungen und Methoden, um mittels dieser Technik die Bildung von NO aus den NO-Donoren zu verfolgen. Mit Hilfe mathematischer Verfahren konnten aus den aufgezeichneten Freisetzungskurven Zerfallshalbwertszeiten und Dissoziationskonstanten bestimmt werden.

Die LMR-Untersuchungen gaben Aufschluss über den Einfluss der molekularen Struktur sowie der stoff- und methodenabhängigen Parameter auf die NO-Freisetzung. Fallende pH-Werte und ein Anstieg der Temperatur führen zu einer beschleunigten NO-Liberation, ebenso verändern

Puffervolumen und Fließgeschwindigkeit des Transportgases methodenabhängig die registrierte Freisetzungsgeschwindigkeit.

Die Untersuchungen zur Struktur-Freisetzungsbeziehung zeigen, dass das Liberationsprofil der NONOate sowohl vom Amingrundgerüst als auch von der Substitution bestimmt wird. Die Pyrrolidinderivate weisen gegenüber Piperidin - gefolgt von offenkettigen Aminen und Piperazin - die höchsten Freisetzungsraten auf. Elektronenziehende Gruppen (COO^- ; CONH_2) in direkter Nachbarschaft der $[\text{N}(\text{O})\text{NO}]^-$ -Gruppe steigern das Liberationspotential des Donors, wobei eine Carboxylgruppe die Freisetzungsgeschwindigkeit gegenüber dem unsubstituierten Piperidinderivat vervierfacht, ein Carbonsäureamidrest nur verdreifacht. Eine zunehmende α -Alkylierung des Piperidinringes verzögert die Freisetzungsgeschwindigkeit der NONOate. Durch eine direkte Verknüpfung mit Aromaten (N-Phenylpiperazin) werden die Freisetzungsraten der Piperazinderivate gesteigert.

Abschließend wurde das NO-Freisetzungsverhalten aus Diazeniumdiolaten in Tierblut untersucht. Im Gegensatz zu den Verhältnissen in Pufferlösungen treten nur sehr geringe Mengen an NO spontan in die Gasphase über. Vielmehr wird NO an endogene Thiole gebunden und oxidativ zu Nitrit und Nitrat verstoffwechselt. Die jeweiligen Anteile wurden durch chemoselektive Reduktionen zu NO ermittelt.

Die vasodilatatorische Potenz der NONOate wurde in Kooperation mit dem Arbeitskreis Prof. Dr. Fricke in Köln an mit $\text{PGF}_{2\alpha}$ -vorkontrahierten Koronararterien des Hausschweins bestimmt. Danach vasodilieren alle vermessenen NONOate stärker als GTN und PETN. Darüber hinaus konnte eine Korrelation zwischen Freisetzungsgeschwindigkeit und Gefäßmotorik abgeleitet werden. Die Vasodilatation durch kurzlebige Diazeniumdiolate erfolgt rasch, langsame NONOate zeigen eine langandauernde Relaxation der Gefäße. Im Gegensatz zu den organischen Nitraten ist die durch Diazeniumdiolate bewirkte Vasodilatation reversibel.

E Experimenteller Teil

1. Abkürzungsverzeichnis

AAV	Allgemeine Arbeitsvorschrift
abs.	absolut
d	Dublett
d. Th.	der Theorie
DC	Dünnschichtchromatographie
dc	dünnschichtchromatographisch
dest.	destilliert
DMSO	Dimethylsulfoxid
EA	Elementaranalyse
et al.	et alter
Et ₂ O	Diethylether
EtOH	Ethanol
h	Stunde
Hz	Hertz
i. Vak.	im Vakuum
IR	Infrarotspektrum
J	Kopplungskonstante
konz.	konzentriert
LMRS	Laser Magnet Resonanz Spektroskopie
m	Multiplett
MeOH	Methanol
MG	Molekulargewicht
MHz	Megahertz
n	Stoffmenge
ppb	parts per billion
ppm	parts per million
q	Quartett
r.F.	relative Freisetzungskonstante
RT	Raumtemperatur
s	Singulett
s	Sekunde
Sdp.	Siedepunkt
Smp.	Schmelzpunkt
STABW	Standardabweichung
t	Triplett
T	Temperatur
t	Zeit
THF	Tetrahydrofuran
tr.	trocken
verd.	verdünnt
δ	chemische Verschiebung

2. Verzeichnis der benutzten Geräte und Analysenmethoden

Schmelzpunkte

Die Schmelzpunkte wurden mit dem „Melting Point Apparatus“ der Firma Gallenkamp ermittelt und sind nicht korrigiert.

Dünnschichtchromatographie

Zur analytischen Dünnschichtchromatographie wurden Kieselgel-Fertigfolien vom Typ 60 F₂₄₅ der Firma Merck verwendet. Die Entwicklung erfolgte unter Kammersättigung mit dem in der Monographie angegebenen Laufmittel. Zur Detektion wurde die Fluoreszenzlöschung bei 254 nm und die Eigenfluoreszenz bei 366 nm genutzt (Universal UV-Lampe „29200“ der Firma CAMAG).

Elementaranalysen

Die CHN-Analysen wurden im Pharmazeutischen Institut der Universität Bonn mit dem „Vario EL“ (Fa. Elementar) durchgeführt.

Molekularmassen

Die Molekularmassen wurden nach der Atomgewichtstabelle von 1962 - bezogen auf ¹²C - berechnet.

Infrarotspektren

Die IR-Spektren wurden mit dem FT-IR-Spektrometer „Paragon 1000“ der Firma Perkin Elmer angefertigt.

Kernresonanzspektren

¹H-NMR-Spektren wurden auf den Geräten Bruker WH 90 (90 MHz), Bruker AC 200 (200 MHz), Bruker WM 400 (400 MHz) und Bruker WM 500 (500 MHz) aufgenommen.

Säulenchromatographie

Die jeweils zu chromatographierende Substanz wurde in wenig mobiler Phase gelöst und auf eine mit Kieselgel (40-60 µm) gefüllte Glassäule gegeben. Unter DC Kontrolle wurden Fraktionen von ca. 10 ml gesammelt.

Laser Magnet Resonanz Spektroskopie

Zur Durchführung der LMRS-Untersuchungen wurden vom Institut für angewandte Physik (Prof. Dr. W. Urban) und der Firma IN VIVO® (Ralph Gäbler) LMR-Spektrometer mit einem CO-Festfrequenzlaser zur Verfügung gestellt.

3. Allgemeine Arbeitsvorschriften (AAV)

AAV 1 *Darstellung von Diazeniumdiolaten sekundärer Monoamine (1)*

Zu der in der Monographie angegebenen Menge Amin in trockenem Methanol wird unter Rühren eine Lösung der angegebenen Menge an Natriummethanolat in tr. Methanol gegeben. Aufgrund von Löslichkeitsproblemen wird die Verwendung einer methanolischen 5.4 M Natriummethanolat-Lösung (FLUKA®) empfohlen, die der Monographie entsprechend mit Methanol verdünnt wird. Die klare Lösung wird in das Teflongefäß des Autoklaven gegeben. Nach **AAV 3** wird der Autoklav evakuiert und mit 3 bar Stickstoffmonoxid belastet. Nach der angegebenen Zeit wird das ausgefallene Produkt abgesaugt, filtriert und mit Diethylether gewaschen. Wird kein Niederschlag erhalten, wird die Mutterlauge so lange mit tr. Diethylether versetzt bis sich das NONOat ausfällt. Das Diazeniumdiolat wird anschließend unter Vakuum für 48 Stunden getrocknet.

AAV 2 *Darstellung von Diazeniumdiolaten sekundärer Monoamine (2)*

Zu der in der Monographie angegebenen Menge Amin in tr. Acetonitril und tr. Diethylether wird unter Rühren eine Lösung der angegebenen Menge an Natriummethanolat in Methanol gegeben. Aufgrund von Löslichkeitsproblemen wird die Verwendung einer methanolischen 5.4 M Natriummethanolat-Lösung (FLUKA®) empfohlen, die der Monographie entsprechend mit Methanol verdünnt wird. Nachdem sich die Substanz komplett gelöst hat, wird die klare Lösung in das Teflongefäß des Autoklaven gegeben. Anschließend wird die Synthese wie unter **AAV 1** durchgeführt.

AAV 3 *Durchführung der NONOat-Synthese*

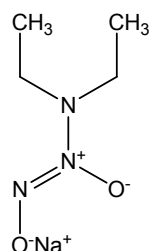
Die Apparatur zur Synthese von Diazeniumdiolaten ist in *Abb. 21* dargestellt.

Das Teflongefäß wird mit der Reaktionslösung versehen. Das Gefäß sollte nicht mehr als dreiviertel gefüllt sein, um ein Übertreten der Lösung in das Gasleitungssystem während der nachfolgenden Evakuierung zu vermeiden. Der Autoklav wird sorgfältig verschlossen und der Rührer auf 500 U/min eingestellt. Zu Beginn des anschließenden Evakuierungs- und Spülvorgangs werden die Ventile **A** und **B** der N₂-Gasflasche und des Spülblocks so geöffnet, dass über den Druckregler **C** 3 bar Stickstoff eingestellt werden können. Durch Öffnen des Nadelventils **D** gelangt das Spülgas in die Apparatur und verdrängt anwesenden Luftsauerstoff. Über den Zweiwegehahn **H** wird mit Hilfe der Wasserstrahlpumpe die gesamte Apparatur evakuiert. Evakuierungs- und Spülvorgang werden abwechselnd dreimal durchgeführt. Nach der letzten Entgasung werden die Ventile **B** (!) und **F** verschlossen und es beginnt die NO-Einleitung. Bevor die NO-Flasche geöffnet wird, müssen das Nadelventil **D** und der Druckregler **C** fest verschlossen sein. Dann werden mit **C** 3 bar NO eingestellt und über **D** das Gas über den Verteiler zum stets geöffneten Autoklaven geleitet. Über die Temperaturanzeige kann der Reaktionsverlauf zunächst überwacht werden. Bei geöffneter NO-Flasche wird die Lösung die angegebene Zeit gerührt.

Nach Beendigung der Reaktion wird die NO-Druckflasche fest verschlossen und überschüssiges NO über **G** in den Abzugsschacht geleitet. Anschließend wird wie zuvor beschrieben die ganze Apparatur evakuiert und mit Stickstoff gespült. Dabei ist darauf zu achten, dass kein NO an den Druckregler der Stickstoffflasche gelangt. Der Autoklav sollte erst dann geöffnet werden, wenn sicher ausgeschlossen werden kann, dass sich keine nitrosen Gase mehr in der Apparatur befinden.

4. Monographien

Natrium 1-(N, N-diethylamino)-diazen-1-ium-1,2-diolat (13a)



Literatur: (Drago and Paulik, 1960)

MG: 155.18 g/mol ($C_4H_{10}N_3O_2Na$)

Darstellung: 14.6 g (0.2 mol) Diethylamin in 50 ml Et_2O und 50 ml H_3CCN werden mit 10.8 g (0.2 mol) Natriummethanolat in 50 ml Methanol nach **AAV 2** umgesetzt. Die Reaktionszeit beträgt 24 Stunden.

Aussehen: weißes Pulver

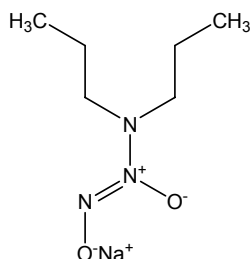
Ausbeute: 2.1 g (6.9% d. Th.)

IR (KBr, cm^{-1}): 3412, 3000, 1610, 1362, 1222, 1184, 1145, 953, 906, 858, 826, 791, 623

H-NMR (D_2O , 400 MHz):

Verschiebung [ppm]	Multiplizität	H-Anzahl	H-Positionen / Kopplungskonstanten
0.95	t	6	2 x N-CH ₂ CH ₃ ($^3J = 7$ Hz)
2.95	q	4	2 x N-CH ₂ CH ₃ ($^3J = 7$ Hz)

Zerfallshalbwertszeit: 45 ± 2 s (20°C; pH 6.0); 460 ± 60 s (20°C; pH 7.4);
 180 ± 50 s (37°C; pH 7.4); 60 ± 10 s (60°C; pH 7.4)

Natrium 1-(N, N-dipropylamino)-diazon-1-ium-1,2-diolat (13b)

Literatur: (Drago and Karstetter, 1961)

MG: 183.08 g/mol ($C_6H_{14}N_3O_2Na$)

Darstellung: 20.21 g (0.2 mol) Dipropylamin in 50 ml Et_2O und 50 ml H_3CCN werden mit 10.80 g (0.2 mol) Natriummethanolat in 50 ml Methanol nach **AAV 2** umgesetzt. Die Reaktionszeit beträgt 24 Stunden.

Aussehen: weißes Pulver

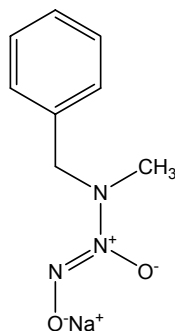
Ausbeute: 2.6 g (7.1 % d. Th.)

IR (KBr, cm^{-1}): 3391, 2253, 1652, 1616, 1256, 1362, 1266, 1176, 1100, 1011, 935, 908, 856, 826, 792, 668, 623, 577

1H -NMR(D_2O , 500 MHz):

Verschiebung [ppm]	Multiplizität	H-Anzahl	H-Positionen / Kopplungskonstanten
0.89	t	3	2 x N-CH ₂ CH ₂ <u>CH</u> ₃ ($^3J = 7.5$ Hz)
1.33	m	2	2 x N-CH ₂ <u>CH</u> ₂ CH ₃ ($^3J = 7.5$ Hz)
2.85	t	2	2 x N- <u>CH</u> ₂ CH ₂ CH ₃ ($^3J = 7.5$ Hz)

Zerfallshalbwertszeit: 50 s (20°C; pH 6.0); 350 s (20°C; pH 7.4).

Natrium 1-(N-benzyl-N-methylamino)-diazen-1-ium-1,2-diolat (13c)

Literatur: (Saavedra and Srinivasan, 2001)

MG: 203.1 g/mol ($C_8H_{10}N_3O_2Na$)

Darstellung: 24.2 g (0.2 mol) N-Benzyl-N-methylamin in 50 ml Et_2O und 50 ml H_3CCN werden mit 10.8 g (0.2 mol) Natriummethanolat in 50 ml Methanol nach **AAV 2** umgesetzt. Die Reaktionszeit beträgt 48 Stunden.

Aussehen: weißes Pulver

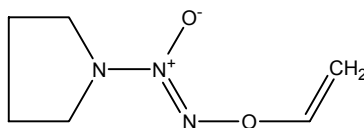
Ausbeute: 20.9 g (51.3 % d. Th.)

IR (KBr, cm^{-1}): 3398, 2853, 1618, 1454, 1368, 1345, 1278, 1251, 1231, 1162, 1093, 1075, 973, 943, 760, 711, 556

1H -NMR (D_2O , 90 MHz)

Verschiebung [ppm]	Multiplizität	H-Anzahl	H-Positionen
2.85	s	3	N-CH ₃
4.1	s	2	N-CH ₂ -Ar
7.4	m	5	aromat. H

Zerfallshalbwertszeit: 20 ± 4 s (20°C; pH 6); 370 ± 20 s (20°C; pH 7.4); 460 ± 60 s (20°C; pH 8);

O-Vinyl 1-(Pyrrolidin-1-yl)diazen-1-ium-1,2-diolat (15)

Literatur: (Saavedra, Billiar, Williams, Kim, Watkins, and Keefer, 1997)

MG: 157.19 g/mol (C₆H₁₁N₃O₂)

Darstellung: Eine Suspension von 18 g (0.118 mol) **16a** in 150 ml THF wird auf 0°C abgekühlt (Eisbad). 4.5 g wasserfreies Natriumcarbonat werden hinzugefügt, gefolgt von 13 ml (0.15 mol) 1,2-Dibromethan in 30 ml DMSO. Die Mischung wird bei Raumtemperatur 72 h unter Stickstoff gerührt. Das gallertartige Reaktionsgemisch wird anschließend erneut auf 0°C abgekühlt und vorsichtig mit 300 ml destilliertem Wasser versehen. Die Lösung wird mit Ether extrahiert (3 x 100 ml), die organischen Phasen anschließend über Magnesiumsulfat getrocknet und eingeeengt. 3 g (0.013 mol) des Zwischenproduktes [O-(2-Bromoethyl) 1-(Pyrrolidin-1-yl)diazen-1-ium-1,2-diolat] werden ohne Aufarbeitung in 150 THF aufgenommen und mit 15 g NaOH und 1.5 ml Wasser versehen. Die Reaktionsmischung wird übernacht refluxiert. Nach dem Erkalten wird die Mischung im Rotationsverdampfer eingeeengt, in Dichlormethan aufgenommen und mit Wasser gewaschen. Nach dem Trocknen über Natriumsulfat wird das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das erhaltene gelbe Öl wird über eine Säule (h: 24 cm) mit Kieselgel und Dichlormethan als Fließmittel gereinigt.

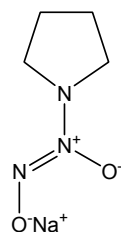
Aussehen: blass-gelbes Öl

Ausbeute: 0.4 g (2 % der Th.)

Rf-Wert: 0.48 (CH₂Cl₂)

H-NMR(D₂O, 90 MHz):

Verschiebung [ppm]	Multiplizität	H-Anzahl	H-Positionen
2.0	m	4	
3.6	m	4	
4.35	m	1	
4.8	m	1	
6.8	m	1	

Natrium 1-(Pyrrolidin-1-yl)diazen-1-ium-1,2-diolat (16a)

Literatur: (Saavedra, Billiar, Williams, Kim, Watkins, and Keefer, 1997)

MG: 153.06 g/mol ($C_4H_8N_3O_2Na$)

Darstellung: 14.21 g (0.2 mol) Pyrrolidin in 50 ml Et_2O und 50 ml H_3CCN werden mit 10.8 g (0.2 mol) Natriummethanolat in 50 ml Methanol nach **AAV 1** umgesetzt. Die Reaktionszeit beträgt 48 Stunden.

Aussehen: weißes Pulver

Ausbeute: 21.1 g (69.1 % d. Th.)

El.-Analyse.: ber.: C = 28.0 % H = 5.7 % N = 24.5 %
 [für $C_4H_8N_3O_2Na \times H_2O$ (171.07g/mol)]
 gef.: C = 27.5 % H = 5.2 % N = 22.6 %

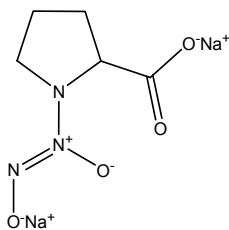
IR (KBr, cm^{-1}): 3744, 3376, 2972, 2872, 2361, 1616, 1464, 1394, 1322, 1224, 1183, 1127, 1106, 984, 901, 573, 519

1H -NMR(D_2O , 90 MHz)

Verschiebung [ppm]	Multiplizität	H-Anzahl	H-Positionen
1.9	m	4	
3.2	m	4	

Zerfallshalbwertszeit: 0.73 s (20°C; pH 6)*; 15 ± 3 s (20°C; pH 7.4); 40 s (20°C; pH 8).

*): extrapoliert

Dinatrium 1-[2-(Carboxylato)pyrrolidin-1-yl]diazon-1-ium-1,2-diolat (16c)

Literatur: (Saavedra, Southan, Davies, Lundell, Markou, Hanson, Adrie, Hurford, Zapol, and Keefer, 1996)

MG: 219.06 g/mol (C₅H₇N₃O₄Na₂)

Darstellung: 1.15 g (0.01 mol) DL-Prolin in 40 ml Methanol werden mit 1.08 g (0.02 mol) Natriummethanolat in 10 ml Methanol nach **AAV 1** umgesetzt. Die Reaktionszeit beträgt 36 Stunden.

Aussehen: weißes Pulver

Ausbeute: 0.82 g (37.6 % d. Th.)

El.-Analyse.: ber.: C = 27.4 % H = 3.2 % N = 19.2 %
 gef.: C = 24.1 % H = 4.4 % N = 15.9 %

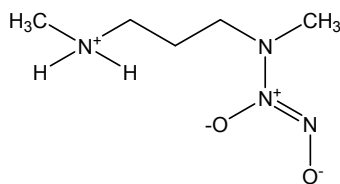
IR (KBr, cm⁻¹): 3443, 2981, 2882, 1674, 1615, 1422, 1372, 1345, 1304, 1263, 1198, 1179, 1123, 1094, 1047, 1005, 960, 929, 848, 782, 596

H-NMR(D₂O, 500 MHz):

Verschiebung [ppm]	Multiplizität	H-Anzahl	H-Positionen
1.8 - 2.3	m	4	
3.25 - 3.45	m	2	
4.05	m	1	

Zerfallshalbwertszeit: 0.68 s (20°C; pH 6)*; 13 ± 3 s (20°C; pH 7.4); 21 s (20°C; pH 8).

*) extrapoliert

1-{N-methyl-N-[6-(N-methylammonium)-propyl]-amino}-diazen-1-ium-1,2-diolat (17)

Literatur: (Hrabie, Klose, Wink, and Keefer, 1993)

MG: 162.09 g/mol (C₅H₁₄N₄O₂)

Darstellung: 8.0 g (0.078 mol) 1,3-Bis-(methylamino)-propan in 50 ml THF werden in das Teflongefäß des Autoklaven gegeben. Nach **AAV 3** wird der Autoklav evakuiert und mit 3 bar Stickstoffmonoxid belastet. Nach der angegebenen Zeit wird das ausgefallene Produkt abgesaugt, filtriert und mit Diethylether gewaschen. Die Reaktionszeit beträgt 24 Stunden. Das Diazeniumdiolat wird anschließend unter Vakuum für 48 Stunden getrocknet.

Aussehen: weißes Pulver

Ausbeute: 1.78 g (14.1 % d. Th.)

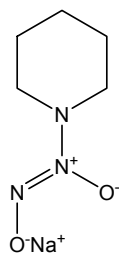
El.-Analyse.: ber.: C = 37.0 % H = 8.6 % N = 34.5 %
 gef.: C = 37.1 % H = 8.7 % N = 33.6 %

IR (KBr, cm⁻¹): 3019, 2973, 2952, 2751, 2343, 1653, 1606, 1517, 1256, 1366, 1297, 1255, 1212, 1186, 1154, 1064, 1049, 979, 948, 901, 846, 759, 644, 618, 562, 521,

H-NMR(D₂O, 500 MHz)

Verschiebung [ppm]	Multiplizität	H-Anzahl	H-Positionen / Kopplungskonstanten
1.70	m	2	-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -
2.70	s	3	N-CH ₃
2.75	s	3	N-CH ₃
3.0 - 3.1	m	4	-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -

Zerfallshalbwertszeit: 70 s (20°C; pH 6); 1150 s (20°C; pH 7.4).

Natrium 1-(Piperidin-1-yl)diazen-1-ium-1,2-diolat (21 a)

Literatur: (Drago and Karstetter, 1961)

MG: 167.07 g/mol ($C_5H_{10}N_3O_2Na$)

Darstellung: 5.10 g (0.06 mol) Piperidin in 15 ml Et_2O und 15 ml H_3CCN werden mit 3.24 g (0.06 mol) Natriummethanolat in 10 ml Methanol nach **AAV 2** umgesetzt. Die Reaktionszeit beträgt 48 Stunden.

Aussehen: weißes Pulver

Ausbeute: 4.2 g (42.0 % d.Th.)

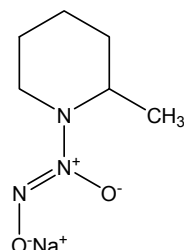
El.-Analyse.: ber.: C = 35.9 % H = 6.0 % N = 25.1 %
 gef.: C = 36.6 % H = 6.2 % N = 24.9 %

IR (KBr, cm^{-1}): 3451, 3370, 2940, 2855, 2838, 2234, 1677, 1473, 1454, 1442, 1356, 1291, 1268, 1215, 1184, 1137, 1096, 1063, 1032, 942, 912, 884, 828, 726, 575,

1H -NMR(D_2O , 90 MHz)

Verschiebung [ppm]	Multiplizität	H-Anzahl	H-Positionen
1.3 - 1.9	m	6	
3.1	m	4	

Zerfallshalbwertszeit: 8 ± 1 s (20°C; pH 6); 125 ± 10 s (20°C; pH 7.4); 440 s (20°C; pH 8);
 25 ± 1 s (37°C; pH 7.4); 7 ± 1 s (60°C; pH 7.4).

Natrium 1-(2-Methylpiperidin-1-yl)diazen-1-ium-1,2-diolat (21 b)

MG: 181.08 g/mol ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}_3\text{O}_2\text{Na}$)

Darstellung: 9.91 g (0.1 mol) 2-Methylpiperidin in 25 ml Et_2O und 25 ml H_3CCN werden mit 5.4 g (0.1 mol) Natriummethanolat in 20 ml Methanol nach **AAV 2** umgesetzt. Die Reaktionszeit beträgt 60 Stunden.

Aussehen: weißes Pulver

Ausbeute: 3.6 g (20 % d. Th.)

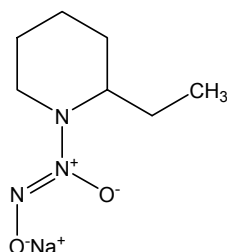
El.-Analyse: ber.: C = 37.2 % H = 6.6 % N = 21.7 %
 [für $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}_3\text{O}_2\text{Na} \times 2 \text{H}_2\text{O} \times \text{CH}_3\text{CN}$ (258.16 g/mol)]
 gef.: C = 36.7 % H = 6.4 % N = 21.6 %

IR (KBr, cm^{-1}): 3436, 2973, 2936, 2854, 2257, 1617, 1445, 1381, 1271, 1236, 1205, 1186, 1146, 1103, 1060, 990, 946, 910, 858, 828, 806, 716, 624, 532

$^1\text{H-NMR}$ (D_2O , 90 MHz):

Verschiebung [ppm]	Multiplizität	H-Anzahl	H-Positionen
0.9	d	3	C- CH_3
1.2 - 2.0	m	6	
2.9 - 3.2	m	3	

Zerfallshalbwertszeit: 50 ± 3 s (20°C; pH 6); 280 ± 3 s (20°C; pH 7.4); 500 s (20°C; pH 8); 200 s (37°C; pH 7.4); 55 s (60°C; pH 7.4).

Natrium 1-(2-Ethylpiperidin-1-yl)diazen-1-ium-1,2-diolat (21c)

MG: 195.09 (C₇H₁₄N₃O₂Na)

Darstellung: 11.31 g (0.1 mol) 2-Ethylpiperidin in 50 ml CH₃CN werden mit 5.4 g (0.1 mol) Natriummethanolat in 20 ml Methanol nach **AAV 2** umgesetzt. Die Reaktionszeit beträgt 24 Stunden.

Aussehen: weißes Pulver

Ausbeute: 4.0 g (20.6 % d. Th.)

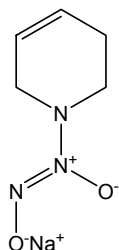
El.-Analyse.: ber.: C = 39.7 % H = 7.7 % N = 20.6 %
 gef.: C = 19.7 % H = 3.7 % N = 20.7 %

IR (KBr, cm⁻¹): 3445, 2952, 2832, 2779, 2716, 2683, 1652, 1615, 1362, 1236, 774, 766,

H-NMR(D₂O, 200 MHz):

Verschiebung [ppm]	Multiplizität	H-Anzahl	H-Positionen / Kopplungskonst. [Hz]
0.65 - 0.8	t	3	-CH ₂ -CH ₃
1.0 - 1.45	m	4	
1.4 - 1.9	m	4	
2.65 - 2.85	m	1	
2.9 - 3.05	m	2	

Zerfallshalbwertszeit: 40 ± 2 s (20°C; pH 6); 325 s (20°C; pH 7.4);
 210 s (37°C; pH 7.4); 45 s (60°C; pH 7.4).

Natrium 1-(3,4-Dihydropiperidin-1-yl)diazen-1-ium-1,2-diolat (21 f)

MG: 165.07 ($C_5H_8N_3O_2Na$)

Darstellung: 0.83 g (0.01 mol) 3,4-Dihydropiperidin in 15 ml Et_2O und 15 ml H_3CCN werden mit 0.54 g (0.01 mol) Natriummethanolat in 10 ml Methanol nach **AAV 2** umgesetzt. Die Reaktionszeit beträgt 24 Stunden.

Aussehen: weißes Pulver

Ausbeute: 0.5 g (30.0 % d. Th.)

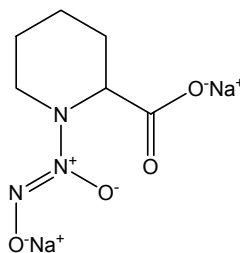
El.-Analyse.: ber.: C = 32.7 % H = 5.4 % N = 22.9 %
 [für $C_5H_8N_3O_2Na \times 2 H_2O \times CH_3CN$ (242.16 g/mol)]
 gef.: C = 28.7 % H = 5.8 % N = 19.9 %

IR (KBr, cm^{-1}): 3465, 3357, 3038, 2969, 2932, 2843, 2829, 1683, 1464, 1377, 1353, 1281, 1240, 1214, 1176, 1101, 1068, 1045, 1014, 959, 938, 900, 861, 798

H-NMR(D_2O , 500MHz):

Verschiebung [ppm]	Multiplizität	H-Anzahl	H-Positionen
1.9	m	2	
3.2	t	2	
3.65	m	2	
5.7 - 5.86	m	2	

Zerfallshalbwertszeit: 7 s (20°C; pH 6); 145 s (20°C; pH 7.4); 540 s (20°C; pH 8).

Dinatrium 1-[2-(Carboxylato)piperidin-1-yl]diazon-1-ium-1,2-diolat (21g)

MG: 233.07 g/mol ($C_6H_9N_3O_4Na_2$)

Darstellung: 12.91 g (0.1 mol) Piperidin-2-carbonsäure in 40 ml Methanol werden mit 10.80 g (0.2 mol) Natriummethanolat in 40 ml Methanol nach **AAV 1** umgesetzt. Die Reaktionszeit beträgt 48 Stunden.

Aussehen: weißes Pulver

Ausbeute: 9.5 g (40.9 % d. Th.)

El.-Analyse.: ber.: C = 31.6 % H = 4.9 % N = 15.8 %
 [für $C_6H_9N_3O_4Na_2 \times CH_3OH$ (265.11 g/mol)]
 gef.: C = 31.5 % H = 5.8 % N = 16.1 %

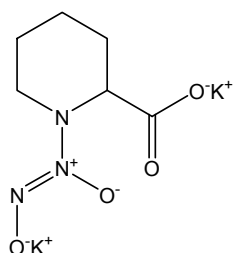
IR (KBr, cm^{-1}): 3420, 2938, 2851, 1593, 1430, 1381, 1321, 1293, 1234, 1167, 1126, 1098, 1052, 977, 944, 914, 854, 775, 741, 726, 668, 550, 510

1H -NMR(D_2O , 400 MHz):

Verschiebung' [ppm]	Multiplizität	H-Anzahl	H-Positionen
1.28 - 1.50	m	2	
1.55 - 1.85	m	3	
1.95 - 2.06	m	1	
2.88 - 3.0	m	1	
3.19 - 3.3	m	1	
3.52 - 3.63	m	1	

Zerfallshalbwertszeit: 1.54 s (20°C; pH 6)*; 30 ± 6 s (20°C; pH 7.4); 75 ± 5 s (20°C; pH 8);
 11 ± 6 s (37°C; pH 7.4); 6 ± 2 s (60°C; pH 7.4).

*): extrapoliert

Dikalium 1-[2-(Carboxylato)piperidin-1-yl]diazen-1-ium-1,2-diolat (21h)

MG: 225.09 (C₆H₉N₃O₄K₂)

Darstellung: 5.16 g (0.04 mol) Piperidin-2-carbonsäure in 40 ml Methanol werden mit 4.32 g (0.08 mol) Natriummethanolat in 40 ml Methanol nach **AAV 1** umgesetzt. Die Reaktionszeit beträgt 72 Stunden.

Aussehen: weißes Pulver

Ausbeute: 5.1 g (57.1 % d. Th.)

El.-Analyse.: ber.: C = 27.1 % H = 3.4 % N = 15.8 %
 gef.: C = 26.7 % H = 3.7 % N = 14.9 %

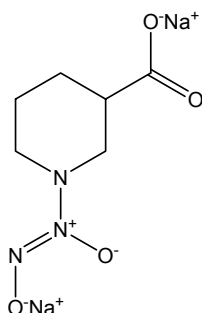
IR (KBr, cm⁻¹): 3429, 2935, 2854, 1593, 1441, 1410, 1356, 1320, 1256, 1239, 1217, 1160, 1093, 1059, 1040, 967, 940, 909, 854, 772, 737, 724, 580

H-NMR(D₂O, 200 MHz):

Verschiebung [ppm]	Multiplizität	H-Anzahl	H-Positionen / Kopplungskonst. [Hz]
1.28 - 1.50	m	2	
1.55 - 1.85	m	3	
1.95 - 2.06	m	1	
2.88 - 3.0	m	1	
3.19 - 3.3	m	1	
3.52 - 3.63	m	1	

Zerfallshalbwertszeit: 1.24 s (20°C; pH 6)*; 30 s (20°C; pH 7.4); 75 s (20°C; pH 8);
 25 ± 1 s (37°C; pH 7.4); 7 ± 1 s (60°C; pH 7.4).

*): extrapoliert

Dinatrium 1-[3-(Carboxylato)piperidin-1-yl]diazon-1-ium-1,2-diolat (21i)

MG: 233.07 (C₆H₉N₃O₄Na₂)

Darstellung: 12.91 g (0.1 mol) Piperidin-3-carbonsäure in 40 ml Methanol werden mit 10.8 g (0.2 mol) Natriummethanolat in 40 ml Methanol nach **AAV 1** umgesetzt. Die Reaktionszeit beträgt 48 Stunden.

Aussehen: weißes Pulver

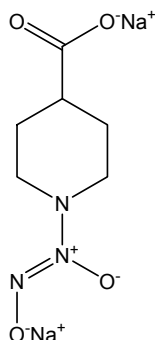
Ausbeute: 7.3 g (31.4 % d. Th.)

IR (KBr, cm⁻¹): 3674, 3303, 2944, 2806, 1699, 1683, 1652, 1634, 1575, 1557, 1538, 1418, 1368, 1287, 1244, 1156, 1141, 1113, 1078, 1035, 1002, 962, 881, 861

H-NMR(D₂O, 400 MHz):

Verschiebung [ppm]	Multiplizität	H-Anzahl	H-Positionen / Kopplungskonst. [Hz]
1.2 - 2.0	m	4	
2.1 - 2.25	m	1	
2.3 - 3.0	m	4	

Zerfallshalbwertszeit: 5 s (20°C; pH 6); 115 s (20°C; pH 7.4); 255 s (20°C; pH 8);
25 s (37°C; pH 7.4); 8 s (60°C; pH 7.4).

Dinatrium 1-[4-(Carboxylato)piperidin-1-yl]diazon-1-ium-1,2-diolat (21k)

MG: 233.07 (C₆H₉N₃O₄Na₂)

Darstellung: 12.9 g (0.1 mol) Piperidin-4-carbonsäure in 40 ml Methanol werden mit 10.8 g (0.2 mol) Natriummethanolat in 40 ml Methanol nach **AAV 1** umgesetzt. Die Reaktionszeit beträgt 48 Stunden.

Aussehen: weißes Pulver

Ausbeute: 6.9 g (29.8 % d. Th.)

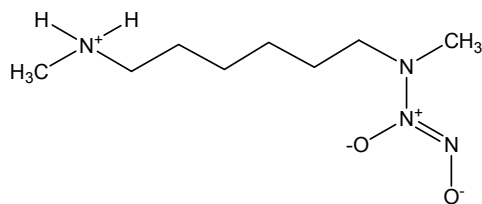
El.-Analyse.: ber.: C = 29.2 % H = 4.8 % N = 15.7 %
[für C₆H₉N₃O₄Na₂ x H₂O x 0.5 CH₃OH (267.13 g/mol)]
gef.: C = 28.3 % H = 4.7 % N = 15.6 %

IR (KBr, cm⁻¹): 3360, 2953, 2853, 1544, 1418, 1381, 1360, 1250, 1210, 1173, 1106, 1039, 944, 885, 827, 789, 668, 544, 475

H-NMR(D₂O, 400 MHz):

Verschiebung [ppm]	Multiplizität	H-Anzahl	H-Positionen / Kopplungskonst. [Hz]
1.69 - 1.85	m	2	
1.92 - 2.05	m	2	
2.15 - 2.3	m	1	
2.95 - 3.05	m	2	
3.10 - 3.20	m	2	

Zerfallshalbwertszeit: 8 s (20°C; pH 6); 105 s (20°C; pH 7.4); 330 s (20°C; pH 8);
25 s (37°C; pH 7.4); 10 s (60°C; pH 7.4).

1-{N-methyl-N-[6-(N-methylammonium)-hexyl]-amino}-diazen-1-ium-1,2-diolat (22)


Literatur: (Hrabie, Klose, Wink, and Keefer, 1993)

MG: 204.12 g/mol ($C_8H_{20}N_4O_2$)

Darstellung: 4.87 g (0.034 mol) 1,3-Bis-(methyldamino)-hexan in 50 ml CH_3CN werden in das Teflongefäß des Autoklaven gegeben. Nach **AAV 3** wird der Autoklav evakuiert und mit 3 bar Stickstoffmonoxid belastet. Nach der angegebenen Zeit wird das ausgefallene Produkt abgesaugt, filtriert und mit Diethylether gewaschen. Die Reaktionszeit beträgt 24 Stunden. Das Diazoniumdiolat wird i. Vak. 48 h getrocknet.

Aussehen: weißes Pulver

Ausbeute: 2.2 g (30.3 % d. Th.)

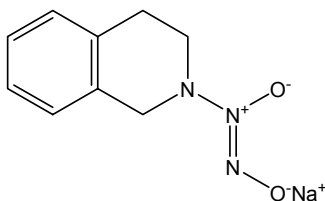
El.-Analyse.: ber.: C = 47.0 % H = 9.8 % N = 27.5 %
 gef.: C = 47.4 % H = 9.9 % N = 26.9 %

IR (KBr, cm^{-1}): 2922, 1506, 1471, 1386, 1308, 1234, 1150, 1071, 1052, 992, 970, 909, 871, 795, 728, 642, 624, 565, 523, 464.

1H -NMR(D_2O , 500 MHz)

Verschiebung [ppm]	Multiplizität	H-Anzahl	H-Positionen / Kopplungskonst. [Hz]
1.3 - 1.4	m	6	C-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -C
1.6 - 1.68	m	2	C-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -C
2.65	s	3	-N-CH ₃
2.75	s	3	-N-CH ₃
2.8 - 3.0	m	4	2 x -CH ₂ -N-

Zerfallshalbwertszeit: 9 s (20°C; pH 6); 340 s (20°C; pH 7.4); 610 s (20°C; pH 8.0).

Natrium 1-(1,2,3,4-Tetrahydroisochinolin-1-yl)diazen-1-ium-1,2-diolat (23a)

MG: 215.11 ($C_9H_{10}N_3O_2Na$)

Darstellung: 4 g (0.03 mol) 1,2,3,4-Tetrahydroisochinolin in 15 ml Et_2O und 15 ml H_3CCN werden mit 1.62 g (0.03 mol) Natriummethanolat in 10 ml Methanol nach **AAV 2** umgesetzt. Die Reaktionszeit beträgt 24 Stunden.

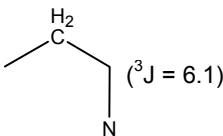
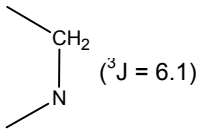
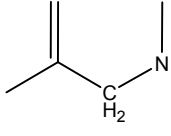
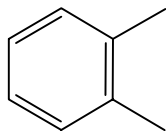
Aussehen: weißes Pulver

Ausbeute: 1.4 g (21.3 % d. Th.)

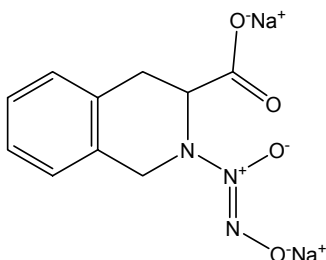
El.-Analyse.: ber.: C = 32.1 % H = 4.1 % N = 16.6 %
 [für $C_9H_{10}N_3O_2Na \times 2 H_2O \times NaNO_3$ (336.4 g/mol)]
 gef.: C = 31.5 % H = 4.1 % N = 18.5 %

IR (KBr, cm^{-1}): 3400, 2937, 2847, 2184, 1700, 1581, 1497, 1455, 1429, 1382, 1357, 1272, 1243, 1182, 1060, 1018, 960, 938, 913, 896, 836, 741, 731, 664, 552

H-NMR(D_2O , 400 MHz):

Verschiebung [ppm]	Multiplizität	H-Anzahl	H-Positionen / Kopplungskonst. [Hz]
3.10	t	2	 ($^3J = 6.1$)
3.40	t	2	 ($^3J = 6.1$)
4.32	s	2	
7.15 - 7.35	m	4	

Zerfallshalbwertszeit: 8 s (20°C; pH 6)*; 160 s (20°C; pH 7.4); 890 s (20°C; pH 8.0).

Dinatrium 1-[3-(Carboxylato)-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-1-yl]diazon-1-ium-1,2-diolat (23b)

MG: 281.11 (C₁₀H₉N₃O₄Na₂)

Darstellung: 1.8 g (0.01 mol) 1,2,3,4-Tetrahydroisochinolin-3-carbonsäure in 40 ml Methanol werden mit 1.08 g (0.02 mol) Natriummethanolat in 10 ml Methanol nach **AAV 1** umgesetzt. Die Reaktionszeit beträgt 24 Stunden.

Aussehen: weißes Pulver

Ausbeute: 1.7 g (60.7 % d. Th.)

El.-Analyse.: ber.: C = 42.7 % H = 3.2 % N = 14.9 %
 gef.: C = 46.5 % H = 4.0 % N = 10.7 %

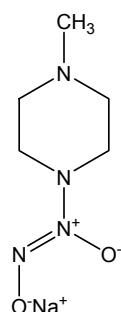
IR (KBr, cm⁻¹): 3312, 3021, 2926, 1588, 1496, 1456, 1432, 1370, 1313, 1227, 1178, 1113, 1033, 966, 906, 794, 741, 668

H-NMR(D₂O, 500 MHz):

Verschiebung [ppm]	Multiplizität	H-Anzahl	H-Positionen / Kopplungskonst. [Hz]
3.04 - 3.3	m	2	
3.48	dd	1	
4.35 - 4.5	dd	2	
7.12 - 7.35	m	4	

Zerfallshalbwertszeit: 1.22 s (20°C; pH 6)*; 25 s (20°C; pH 7.4); 70 s (20°C; pH 8.0).

*) extrapoliert

Natrium 1-(4-Methylpiperazin-1-yl)diazen-1-ium-1,2-diolat (24a)

MG: 182.08 g/mol ($C_5H_{11}N_4O_2Na$)

Darstellung: 20.01 g (0.2 mol) N-Methylpiperazin in 50 ml Et_2O und 50 ml H_3CCN werden mit 10.80 g (0.2 mol) Natriummethanolat in 50 ml Methanol nach **AAV 2** umgesetzt. Die Reaktionszeit beträgt 24 Stunden.

Aussehen: weißes Pulver

Ausbeute: 4.2 g (12.0 % d. Th.)

El.-Analyse.: ber.: C = 30.1 % H = 6.6 % N = 27.8 %
[für $C_5H_{11}N_4O_2Na \times H_2O$ (200.1 g/mol)]
gef.: C = 30.0 % H = 6.5 % N = 26.8 %

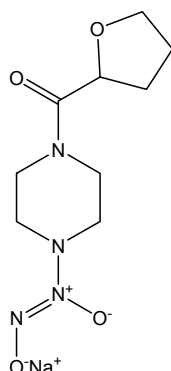
IR (KBr, cm^{-1}): 3468, 3350, 2968, 2943, 2856, 2836, 2790, 2763, 2675, 1684, 1635, 1559, 1454, 1367, 1352, 1284, 1218, 1182, 1150, 1125, 1076, 1050, 1014, 947

H-NMR(D_2O , 500 MHz):

Verschiebung [ppm]	Multiplizität	H-Anzahl	H-Positionen
2.3	s	3	
2.5 - 2.8	m	4	
3.15 - 3.25	m	4	

Zerfallshalbwertszeit: 330 s (20°C; pH 6); 1280 s (20°C; pH 7.4); 1410 s (20°C; pH 8.0)*.

*) extrapoliert

Natrium 1-[4-(Tetrahydro-2-furoyl)piperazin-1-yl]diazen-1-ium-1,2-diolat (24b)

MG: 266.12 (C₉H₁₅N₄O₄Na)

Darstellung: 7.36 g (0.04 mol) 4-(2-Tetrahydrofuranoyl)piperazin in 50 ml Methanol werden mit 2.16 g (0.04 mol) Natriummethanolat in 20 ml Methanol nach **AAV 1** umgesetzt. Die Reaktionszeit beträgt 120 Stunden.

Aussehen: weißes Pulver

Ausbeute: 4.7 g (43.7 % d. Th.)

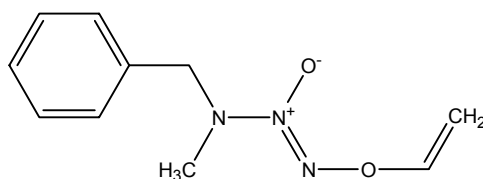
El.-Analyse.: ber.: C = 40.6 % H = 5.7 % N = 21.1 %
 gef.: C = 39.3 % H = 5.7 % N = 21.1 %

IR (KBr, cm⁻¹): 3470, 2858, 1661, 1455, 1358, 1294, 1245, 1179, 1132, 1081, 1042, 954.

H-NMR(D₂O, 200 MHz)

Verschiebung [ppm]	Multiplizität	H-Anzahl	H-Positionen / Kopplungskonst. [Hz]
1.75 - 2.0	m	3	
2.2 - 2.45	m	1	
2.95 - 3.25	m	4	
3.6 - 3.8	m	4	
3.78 - 4.0	m	2	
4.75 - 4.92	m	1	

Zerfallshalbwertszeit: 95 s (20°C; pH 6); 1100 s (20°C; pH 7.4); 1800 s (20°C; pH 8);
 460 s (37°C; pH 7.4).

O-Vinyl 1-(N-Benzyl-N-methyl-1-yl)diazen-1-ium-1,2-diolat (25)

MG: 204.13 g/mol (C₁₀H₁₃N₃O₂)

Darstellung: Eine Suspension von 20.3 g (0.1 mol) **13c** in 160 ml THF wird auf 0°C abgekühlt (Eisbad). 4.5 g wasserfreies Natriumcarbonat werden hinzugefügt, gefolgt von 10 ml (0.116 mol) 1,2-Dibromethan in 20 ml DMSO. Die Mischung wird bei Raumtemperatur 72h unter Stickstoff gerührt. Anschließend wird die Reaktionslösung erneut auf 0°C abgekühlt und vorsichtig mit 200 ml destilliertem Wasser versehen. Das Gemisch wird mit Ether extrahiert, über Magnesiumsulfat getrocknet und eingeeengt. 1.6 g (0.0055 mol) des isolierten Zwischenproduktes O-(2-Bromoethyl) 1-(N-Benzyl-N-methyl-1-yl)diazen-1-ium-1,2-diolat wird ohne Aufarbeitung in 150 THF aufgenommen und mit 15 g NaOH und 1.5 ml Wasser versehen. Die Reaktionsmischung wird übernacht refluxiert. Nach dem Erkalten extrahiert man die Mischung mit Dichlormethan und entfernt das Lösungsmittel i. Vak.. Das erhaltene gelbe Öl wird über eine Säule (h: 24 cm) mit Kieselgel und Dichlormethan als Fließmittel gereinigt.

Aussehen: blass-gelbes Öl

Ausbeute: 0.5 g (2.4 % der Th.)

Rf-Wert: 0.43 (CH₂Cl₂)

IR (KBr, cm⁻¹): 3031, 2960, 2854, 1724, 1496, 1450, 1432, 1329, 1288, 1254, 1167, 1121, 1077, 1027, 960, 888, 874, 848, 711, 613, 588, 460.

H-NMR (D₂O, 500 MHz)

Verschiebung [ppm]	Multiplizität	H-Anzahl	H-Positionen
2.92	s	3	N-CH ₃
4.8	dd	1	
5.28	dd	1	
5.29	s	2	
7.12	dd	1	
7.28 - 7.4	m	5	

Literaturverzeichnis

- Adak S, Wang Q, and Stuehr DJ (2000) Arginine conversion to nitroxide by tetrahydrobiopterin-free neuronal nitric-oxide synthase. Implications for mechanism. *J.Biol.Chem.* **275**:33554-33561.
- Alayash AI, Ryab BAB, and Cashion RE (1998) Peroxynitrite-mediated heme oxidation and protein modification of native and chemically modified hemoglobins. *Arch.Biochem.Biophys.* **349**:65-73.
- Annich GM, Meinhardt JP, Mowery KA, Ashton BA, Merz SI, Hirschl RB, Meyerhoff ME, and Bartlett RH (2000) Reduced platelet activation and thrombosis in extracorporeal circuits coated with nitric oxide release polymers. *Crit.Care.Med.* **28**:915-920.
- Arnold EV, Citro ML, Keefer LK, and Hrabie JA (2002) A nitric oxide-releasing polydiazoniumdiolate derived from acetonitrile. *Org.Lett.* **4**:1323-1325.
- Atkins PW (1990) *Physikalische Chemie*.
- Bartberger MD, Liu W, Ford E, Miranda KM, Switzer C, Fukuto JM, Farmer PJ, Wink DA, and Houk KN (2002) The reduction potential of nitric oxide (NO) and its importance to NO biochemistry. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **99**:10958-10963.
- Bassenge E and Strein K (1986) Dose-dependent effects of isosorbide-5-mononitrate on the venous, arterial and coronary arterial system of conscious dogs. *Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol.* **334**:100-104.
- Bolotina VM, Najibi S, Palacino JJ, Pagano PJ, and Cohen RA (1994) Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature* **368**:850-853.
- Busse R and Fleming I (1996) Endothelial dysfunction in atherosclerosis. *J.Vasc.Res.* **33**:181-194.
- Chen C, Hanson SR, Keefer LK, Saavedra JE, Davies KM, Hutsell TC, Hughes JD, Ku DN, and Lumsden AB (1997) Boundary layer infusion of nitric oxide reduces early smooth muscle cell proliferation in the endarterectomized canine artery. *J.Surg.Res.* **67**:26-32.
- Chen F, Castranova V, Shi X, and Demers LM (1999) New insights into the role of nuclear factor-kappaB, a ubiquitous transcription factor in the initiation of diseases. *Clin.Chem.* **45**: 7-17.
- Chen Z, Zhang J, and Stamler JS (2002) Identification of the enzymatic mechanism of nitroglycerin bioactivation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **99**:8306-8311.
- Cook JA, Kim SY, Teague D, Krishna MC, Pacelli R, Mitchell JB, Vodovotz Y, Nims RW, Christodoulou D, Miles AM, Grisham MB, and Wink DA Convenient colorimetric and fluorometric assays for S-nitrosothiols.
- Cook SJ and McCormick F (1993) Inhibition by cAMP of Ras-dependent activation of Raf. *Science* **262**:1069-1072.
- Cornwell TL, Pryzwansky KB, Wyatt TA, and Lincoln TM (1991) Regulation of sarcoplasmic reticulum protein phosphorylation by localized cyclic GMP-dependent protein kinase in vascular smooth muscle cells. *Mol.Pharmacol.* **40**:923-931.
- Davies KM, Wink DA, Saavedra JE, and Keefer LK (2001) Chemistry of the diazeniumdiolates. 2. Kinetics and mechanism of dissociation to nitric oxide in aqueous solution. *J.Am.Chem.Soc* **123**:5473-5481.
- Davis RJ (1993) The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *J.Biol.Chem.* **268**:14553-14556.
- Derici U and Ozkaya O (2002) Increased plasma nitrate levels in patients with crush syndrome in the Marmara earthquake. *Clinica chimica acta* **322**:99-103.

- Diodati JG, Quyyumi AA, and Keefer LK (1993) Complexes of nitric oxide with nucleophiles as agents for the controlled biological release of nitric oxide: hemodynamic effect in the rabbit. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* **22**: 287-292.
- Drago S and Karstetter BR (1961) The reaction of nitrogen (II) oxide with various primary and secondary amines. *J.Am.Chem.Soc* **83**: 1819-1822.
- Drago S and Paulik FE (1960) The reaction of nitrogen (II) oxide with diethylamine. *J.Am.Chem.Soc* **82**:98.
- Espey MG, Miranda KM, Feelisch M, Fukuto J, Grisham MB, Vitek MP, and Wink DA (2000) Mechanisms of cell death governed by the balance between nitrosative and oxidative stress. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **899**: 209-221.
- Evenson KM (1968) Electron paramagnetic resonance absorption in oxygen with the HCN Laser. *Physical Review Letters* **21**: 1038.
- Foster MW and Stamler JS (2003) S-nitrosylation in health and disease. *Trends in molecular medicine* **9**: 160-169.
- Furchgott RF and Zawadzki JV (1980) The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* **288**: 373-376.
- Garcia-Cardena G, Oh P, Liu J, Schnitzer JE, and Sessa WC (1996) Targeting of nitric oxide synthase to endothelial cell caveolae via palmitoylation: implications for nitric oxide signaling. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **93**: 6448-6453.
- Gäbler R. *Persönliche Mitteilung* 2002.
- Hampl V, Tristani-Firouzi M, Hutsell TC, and Archer SL (1996) Nebulized nitric oxide/nucleophile adduct reduces chronic pulmonary hypertension. *Cardiovasc.Res.* **31**:55-62.
- Hansen TJ, Croisy AF, and Keefer LK (1982) N-nitrosation of secondary amines by nitric oxide via the 'Drago complex'. *IARC Sci.Publ.* 21-29.
- Hinz A (1982) Mid-infrared laser magnetic resonance using the faraday and voigt effects for sensitive detection. *Molec.Phys.* **45**: 1131.
- Hogg N (2002) The biochemistry and physiology of s-nitrosothiols. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* **42**: 585-600.
- Horstmann A, Menzel L, Gabler R, Jentsch A, Urban W, and Lehmann J (2002) Release of nitric oxide from novel diazeniumdiolates monitored by laser magnetic resonance spectroscopy. *Nitric.Oxide.* **6**: 135-141.
- Hrabie JA and Keefer LK (2002) Chemistry of the nitric oxide-releasing diazeniumdiolate ("nitrosohydroxylamine") functional group and its oxygen-substituted derivatives. *Chem.Rev.* **102** : 1135-1154.
- Hrabie JA, Klose JR, Wink DA, and Keefer LK (1993) New nitric oxide-releasing zwitterions derived from polyamines. *J.Org.Chem.* **58**: 1472-1476.
- Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, and Chaudhuri G (1987) Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **84**: 9265-9269.
- Ignarro LJ, Cirino G, Casini A, and Napoli C (1999) Nitric oxide as a signaling molecule in the vascular system: an overview. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* **34**: 879-886.

Ishibashi T, Himeno M, Kubota K, Matsubara T, Hori T, Ozaki K, Yamazoe M, Aizawa Y, Yoshida J, and Nishio M (2003) Decrease in plasma NO_x concentration by isosorbide dinitrate, an organic nitrate ester. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* **41**: 40-48.

Jia L, Bonaventura C, Bonaventura J, and Stamler JS (1996) S-nitrosohaemoglobin: a dynamic activity of blood involved in vascular control. *Nature* **380**: 221-226.

Jourd'heuil D, Hallen K, Feelisch M, and Grisham MB (2000) Dynamic state of S-nitrosothiols in human plasma and whole blood. *Free Radic.Biol.Med.* **28**: 409-417.

Keefer LK (1998) Nitric oxide-releasing compounds: From basic research to promising drugs. *CHEMTECH* **8**: 30-35.

Keefer LK, Flippen-Anderson JL, George C, Shanklin AP, Dunams TM, Christodoulou D, Saavedra JE, Sagan ES, and Bohle DS (2001) Chemistry of the diazeniumdiolates. I. Structural and spectral characteristics of the [N(O)NO]- functional group. *Nitric.Oxide.* **5**: 377-394.

Keefer LK, Nims RW, Davies KM, and Wink DA (1996) "NONOates" (1-substituted diazen-1-ium-1,2-diols) as nitric oxide donors: convenient nitric oxide dosage forms. *Methods Enzymol.* **268**: 281-293.

Knowles P, Marsh D, and Rattle H (1976) Magnetic resonance, in *Magnetic resonance of biomolecules* pp 189-220, J.Wiley & Sons, New York.

Kojda G and Harrison D (1999) Interactions between NO and reactive oxygen species: pathophysiological importance in atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart failure. *Cardiovasc.Res.* **43**: 562-571.

Koppenol WH (1998) The basic chemistry of nitrogen monoxide and peroxyxynitrite. *Free Radic.Biol.Med.* **25**: 385-391.

Lam CF, van Heerden PV, Sviri S, Roberts BL, and Ilett KF (2002) The effects of inhalation of a novel nitric oxide donor, DETA/NO, in a patient with severe hypoxaemia due to acute respiratory distress syndrome. *Anaesth.Intensive Care* **30**: 472-476.

Lehmann J (2000a) Nitric oxide donors - current trends in therapeutic applications. *Exp.Opin.Ther.Patents* **10**: 559-574.

Lehmann J (2000b) NO-Donoren - Übersicht und neuere Entwicklungen, in *Pentaerithrityltetranitrat* (Stalleicken D ed) pp 1-17, Steinkopf, Darmstadt.

Lucas KA, Pitari GM, Kazerounian S, Ruiz-Stewart I, Park J, Schulz S, Chepenik KP, and Waldman SA (2000) Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. *Pharmacol.Rev.* **52**: 375-414.

Ma XL, Gao F, Liu GL, Lopez BL, Christopher TA, Fukuto JM, Wink DA, and Feelisch M (1999) Opposite effects of nitric oxide and nitroxyl on postischemic myocardial injury. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 14617-14622.

Maragos CM, Morley D, Wink DA, Dunams TM, Saavedra JE, Hoffman A, Bove AA, Isaac L, Hrabie JA, and Keefer LK (1991) Complexes of NO with nucleophiles as agents for the controlled biological release of nitric oxide. Vasorelaxant effects. *J.Med.Chem.* **34**: 3242-3247.

Maragos CM, Wang JM, Hrabie JA, Oppenheim JJ, and Keefer LK (1993) Nitric oxide/nucleophile complexes inhibit the in vitro proliferation of A375 melanoma cells via nitric oxide release. *Cancer Res.PG.*

Marley R, Feelisch M (2000) A chemiluminescence-based assay for S-nitrosoalbumin and other plasma S-nitrosothiols. *Free Radical Research.* **32**: 1-9.

McMahon TJ, Exton SA, Bonaventura J, Singel DJ, and Solomon SJ (2000) Functional coupling of oxygen binding and vasoactivity in S- nitrosohemoglobin. *J.Biol.Chem.* **275**: 16738-16745.

McMahon TJ, Moon RE, Lusching BP, Carraway MS, Stone AE, Stolp BW, Gow AJ, Pawloski JR, Watke P, Singel DJ, Piantadosi CA, and Stamler JS (2002) Nitric oxide in the human respiratory cycle. *Nat.Med.* **8**: 711-717.

Menzel, L. Infrarotspektroskopischer Nachweis von Stickstoffmonoxid aus biologischen Quellen. 2000. Dissertation.

Miranda KM, Nims RW, Thomas DD, Espey MG, Citrin D, Bartberger MD, Paolocci N, Fukuto JM, Feelisch M, and Wink DA (2003) Comparison of the reactivity of nitric oxide and nitroxyl with heme proteins. A chemical discussion of the differential biological effects of these redox related products of NOS. *J.Inorg.Biochem.* **93**: 52-60.

Moncada S (1992) *Acta Physiol.Scand.* **145**: 201-227.

Mooradian DL, Hutsell TC, and Keefer LK (1995) Nitric oxide (NO) donor molecules: effect of NO release rate on vascular smooth muscle cell proliferation in vitro. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* **25**: 674-678.

Müller S and Kojda G (2002) Vasoprotektion durch vaskuläres NO. *MMP-Medizinische Monatsschrift für Pharmazeuten* **25**: 45-51.

Mürtz P, Menzel L, Bloch W, Hess A, Michel O, and Urban W (1999) LMR spectroscopy: a new sensitive method for on-line recording of nitric oxide in breath. *J.Appl.Physiol* **86**: 1075-1080.

Napoli C and Ignarro LJ (2001) Nitric oxide and atherosclerosis. *Nitric.Oxide.* **5**: 88-97.

Nathan C and Xie QW (1994) Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J.Biol.Chem.* **269**: 13725-13728.

Nedeianu S (2002) EPR spectroscopy of common nitric oxide - spin trap complexes. *Cell.Mol.Biol.Lett.* **7**: 142-143.

Oberle S, Schwartz P, Abate A, and Schroder H (1999) The antioxidant defense protein ferritin is a novel and specific target for pentaerythrityl tetranitrate in endothelial cells. *Biochem.Biophys.Res Commun.* **261**: 28-34.

Osinski, M. T. and Schrör, K. Antimitogenic actions of sildenafil and organic nitrates via activation of protein kinase A following inhibition of cGMP-inhibited phosphodiesterase. *Basic Res Cardiol* **94**, 403. 1999. Abstract.

Palmer RM, Ferrige AG, and Moncada S (1987) Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* **327**: 524-526.

Pfeiffer S (1998) Electrochemical determination of s-nitrosothiols with a Clark-type nitric oxide electrode. *Anal.Biochem.* **258**: 68.

Pohl U, Holtz J, Busse R, and Bassenge E (1986) Crucial role of endothelium in the vasodilator response to increased flow in vivo. *Hypertension* **8**: 37-44.

Rajan TV, Porte P, Yates JA, Keefer L, and Shultz LD (1996) Role of nitric oxide in host defense against an extracellular, metazoan parasite, *Brugia malayi*. *Infect.Immun.* **64**: 3351-3353.

Rao GH, Krishnamurthi S, Raji L, and White JG (1990) Influence of nitric oxide on agonist-mediated calcium mobilization in platelets. *Biochem.Med.Metab Biol.* **43**: 271-275.

Ross R (1999) Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N.Engl.J.Med.* **340**: 115-126.

Ross R and Fuster V (1996) The pathogenesis of atherosclerosis, in *Atherosclerosis and coronary artery disease*. (Fuster V, Ross R, and Topol EJ eds) pp 441-460, Lippincott, Philadelphia.

Rücker G, Neugebauer M, and Willems GG (1988) *Instrumentelle pharmazeutische Analytik*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart.

Saavedra JE, Billiar TR, Williams DL, Kim YM, Watkins SC, and Keefer LK (1997) Targeting nitric oxide (NO) delivery in vivo. Design of a liver-selective NO donor prodrug that blocks tumor necrosis factor- α -induced apoptosis and toxicity in the liver. *J.Med.Chem.* **40**: 1947-1954.

Saavedra JE and Keefer LK (1992) Secondary amine/nitric oxide complex ions, $R_2N[N(O)NO]$. O-functionalization chemistry. *J.Org.Chem.* **57**: 6134-6138.

Saavedra JE, Southan GJ, Davies KM, Lundell A, Markou C, Hanson SR, Adrie C, Hurford WE, Zapol WM, and Keefer LK (1996) Localizing antithrombotic and vasodilatory activity with a novel, ultrafast nitric oxide donor. *J.Med.Chem.* **39**: 4361-4365.

Saavedra JE and Srinivasan A (2001) The secondary amine/nitric oxide complex ion $R_2N[N(O)NO]$ -as nucleophile and leaving group in SNAr reactions. *J.Org.Chem.* **66**: 3090-3098.

Saville (1958) *Analyst* **83**: 670-672.

Schachinger V, Britten MB, and Zeiher AM (2000) Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long-term outcome of coronary heart disease. *Circulation* **101**: 1899-1906.

Schlossmann J, Ammendola A, Ashman K, Zong X, Huber A, Neubauer G, Wang GX, Allescher HD, Korth M, Wilm M, Hofmann F, and Ruth P (2000) Regulation of intracellular calcium by a signalling complex of IRAG, IP3 receptor and cGMP kinase I β . *Nature* **404**: 197-201.

Schumacher T, Kelm M, and Strauer BE (2001) Determination of plasma nitrate in patients of an intensive care unit. *Intensivmedizin und Notfallmedizin* **38**: 561-569.

Schwartz SM (1997) Smooth muscle migration in atherosclerosis and restenosis. *J.Clin.Invest* **100**: S87-S89.

Smith DJ, Chakravarthy D, Pulfer S, Simmons ML, Hrabie JA, Citro ML, Saavedra JE, Davies KM, Hutsell TC, Mooradian DL, Hanson SR, and Keefer LK (1996) Nitric oxide-releasing polymers containing the $[N(O)NO]$ - group. *J.Med.Chem.* 1148-1156.

Sobrero MA (1846) Sur plusieurs composés détonants produits avec l'acide nitrique et de le sucre, la dextrine, la mannite et la glycérine. *CR Acad.Sci.* **25**: 247-248.

Soderling SH and Beavo JA (2000) Regulation of cAMP and cGMP signaling: new phosphodiesterases and new functions. *Curr.Opin.Cell Biol.* **12**: 174-179.

Srinivasan A, Kebede N, Saavedra JE, Nikolaitchik AV, Brady DA, Yourd E, Davies KM, Keefer LK, and Toscano JP (2001) Chemistry of the diazeniumdiolates. 3. Photoreactivity. *J.Am.Chem.Soc* **123**: 5465-5472.

Stamler JS, Jia L, Eu JP, McMahon TJ, Demchenko IT, Bonaventura J, Gernert K, and Piantadosi CA (1997) Blood flow regulation by S-nitrosohemoglobin in the physiological oxygen gradient. *Science* 2034-2037.

Urban W. and Schmidt C. LMR spectroscopy of free radicals and molecular ions. Homepage of the Molecular Physics Group (2000) Electronic Citation.

Wink DA and Mitchell JB (1998) Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radic.Biol.Med.* **25**: 434-456.

Wink DA, Vodovotz Y, Laval J, Laval F, Dewhirst MW, and Mitchell JB (1998) The multifaceted roles of nitric oxide in cancer. *Carcinogenesis* **19**: 711-721.

Yang F, Troncy E, Francoeur M, Vinet B, Vinay P, Czaika G, and Blaise G (1997) Effects of reducing reagents and temperature on conversion of nitrite and nitrate to nitric oxide and detection of NO by chemiluminescence. *Clin.Chem.* **43**: 657-662.

Zhang H, Annich GM, Miskulin J, Stankiewicz K, Osterholzer K, Merz SI, Bartlett RH, and Meyerhoff ME (2003) Nitric oxide-releasing fumed silica particles: synthesis, characterization, and biomedical application. *J.Am.Chem.Soc* **125**: 5015-5024.

Zinchuk VV and Dorokhina LV (2002) Blood oxygen transport in rats under hypothermia combined with modification of the L-Arginine-NO pathway. *Nitric.Oxide.* **6**: 29-34.

Lebenslauf

Persönliches	Axel Horstmann geboren am 14.11.1972 in Grevenbroich ledig
Schulbildung	
1978-1982	Katholische Grundschule in Bedburg-Kaster
1983-1992	Städtisches Gymnasium in Bedburg
Studium	
1992-1996	Studium der Pharmazie in der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn
1995	1. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
1996	2. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
1997	3. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung und Approbation als Apotheker
Praktische Ausbildung	
1996-1997	Pharmaziepraktikum in der Markt-Apotheke, Meckenheim
1997	Pharmaziepraktikum bei SCHWARZ PHARMA AG, Monheim
Berufliche Tätigkeit	
1997-1998	Teilzeittätigkeit als Angestellter der Rathaus Apotheke in Bedburg-Kaster
seit 1999	Leiter der Grüne Apotheke in Bedburg-Kaster
Promotion	an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn
1998-1999	Wissenschaftliche Hilfskraft, Pharmazeutisches Institut Bonn
1999-2003	Freier Mitarbeiter, Pharmazeutisches Institut Bonn

(Unterschrift des Doktoranden)

Selbständigkeitserklärung

Ich versichere, dass die Dissertation von mir selbst und ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfasst wurde.

(Unterschrift des Doktoranden)